

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Reiner Benecke

Sektion Neuroimmunologie

Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl

microRNA im Kontext der Multiplen Sklerose

**Integrative Analyse von Informationen aus microRNA-Datenbanken und
longitudinale Studie über Expressionsänderungen von microRNA unter Interferon-
beta-Therapie im Blut von Patienten mit Multipler Sklerose**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Charlotte Johanna Angerstein

Geboren am 16.04.1987 in Potsdam

Rostock, 2014

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: PD Dr. med. Klemens Ruprecht, Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie, Charité Berlin
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Ulm

Datum der Einreichung: 19.12.2014

Datum der Verteidigung: 17.11.2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Multiple Sklerose	5
1.1.1.	Epidemiologie	5
1.1.2.	Ätiologie, Pathologie und Pathogenese	5
1.1.2.1.	Genetische Faktoren	6
1.1.2.2.	Exogene Faktoren	6
1.1.2.3.	Autoimmunität	7
1.1.2.4.	Pathologie und Pathophysiologie	8
1.1.3.	Verlaufsformen und Krankheitssymptome	9
1.1.4.	Diagnose und Krankheitsscores	12
1.1.4.1.	Diagnosekriterien	12
1.1.4.2.	Etablierte Scores zur Einschätzung des Schweregrades der Krankheit	13
1.1.5.	Therapie	14
1.2.	MicroRNA	17
1.2.1.	Biomarker	17
1.2.2.	Überblick zu microRNA	19
1.2.2.1.	Geschichte	19
1.2.2.2.	Biogenese und Regulation von microRNA	19
1.2.2.3.	Posttranskriptionelle Regulation durch microRNA	21
1.2.3.	Beteiligung von microRNA im Immunsystem und bei Krankheiten	23
1.2.4.	Überblick zu etablierten microRNA-Datenbanken	24
2.	Ziel- und Fragestellungen	28
2.1.	Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	28
2.2.	Analyse der Expression von microRNA und mRNA im Blut von Multiple Sklerose Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie	30
3.	Material und Methoden	31
3.1.	Integrative Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	31
3.1.1.	Verwendete microRNA-Datenbanken im Detail	31
3.1.1.1.	Assoziationen von microRNA zu Krankheiten	32
3.1.1.2.	Allgemeine Informationen zu microRNA	33
3.1.1.3.	Experimentell ermittelte microRNA-Zielgene	33

3.1.1.4.	Bioinformatische Vorhersage-Algorithmen zur Berechnung von microRNA-Zielgenen	34
3.1.1.5.	Vorhersagen über die Regulation von microRNA durch Transkriptionsfaktoren	37
3.1.1.6.	microRNA-Expressionsprofile von Zelltypen und Geweben	38
3.1.2.	Multiple Sklerose-assoziierte microRNA und ihre Interaktionen mit Zielgenen und Transkriptionsfaktoren	38
3.1.2.1.	Analyse der Interaktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	38
3.1.2.2.	Funktionsanalyse der Zielgene von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	40
3.2.	Expression von microRNA und mRNA im Blut von Multiple Sklerose Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie	41
3.2.1.	Patientenkohorte	41
3.2.2.	Messung der microRNA- und mRNA-Expression unter Interferon-beta-1b- Therapie	42
3.2.2.1.	Blutproben und Messzeitpunkte	43
3.2.2.2.	Quantifizierung der microRNA-Expression	43
3.2.2.3.	Quantifizierung der mRNA-Expression	44
3.2.3.	Auswertung der microRNA- und mRNA-Expressionsdaten	44
3.2.3.1.	Vorverarbeitung und Normalisierung der Daten	44
3.2.3.2.	Filterung von unter Therapie differentiell exprimierten microRNA und mRNA	46
3.2.3.3.	Analyse der Interaktionen von unter Therapie differentiell exprimierten microRNA und mRNA	46
4.	Ergebnisse	48
4.1.	Integrative Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	48
4.1.1.	Multiple Sklerose-assoziierte microRNA aus der Datenbank miR2Disease ...	48
4.1.2.	Charakteristika der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	49
4.1.3.	Interaktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA mit Zielgenen ...	50
4.1.4.	Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit Multiple Sklerose- assoziierten microRNA	53
4.1.5.	Funktionsanalyse der Zielgene von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	56
4.1.6.	Expression von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA in verschiedenen Zelltypen und Geweben	57

4.2.	Analyse der microRNA-Expression im Blut von Multiple Sklerose Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie	59
4.2.1.	Klinische Angaben zur Patientenkohorte	59
4.2.2.	Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten	59
4.2.3.	Unter Therapie differentiell exprimierte microRNA und mRNA	63
4.2.4.	Interaktionen zwischen den unter Therapie verändert exprimierten microRNA und mRNA	67
5.	Diskussion	69
5.1.	Diskussion zu der integrativen Analyse der Zielgene und Funktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	69
5.1.1.	Genomische Analyse der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	69
5.1.2.	Potentiell relevante Zielgene von microRNA bei Multiple Sklerose	70
5.1.3.	Potentiell regulierende Transkriptionsfaktoren von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA	73
5.1.4.	Funktionen und Signalwege, die von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA beeinflusst werden	75
5.1.5.	Expression der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA in Blut und Hirn	77
5.1.6.	Einschränkungen in der Verwendung der Datenbank miR2Disease	79
5.2.	Diskussion der Analyse der microRNA- und mRNA-Expression unter Interferon-beta-1b-Therapie bei Multiple Sklerose Patienten	83
5.2.1.	Patientenkohorte	83
5.2.2.	Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten	84
5.2.3.	Expressionsänderungen von microRNA und mRNA unter Interferon-beta-1b-Therapie	85
5.2.4.	Interaktionen und ausgewählte Zielgene der differentiell exprimierten microRNA unter Interferon-beta-1b-Therapie	89
5.3.	MicroRNA als potentielle Biomarker bei Multipler Sklerose	91
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literaturverzeichnis	96
8.	Anhang	113
8.1.	Thesen	113
8.2.	Abbildungsverzeichnis	116
8.3.	Tabellenverzeichnis	117

8.4.	Abkürzungsverzeichnis	118
8.5.	Danksagung	121
8.6.	Lebenslauf	122
8.7.	Selbstständigkeitserklärung	124

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Epidemiologie

Multiple Sklerose (MS) ist mit geschätzt 2 Millionen weltweit Betroffenen die häufigste, chronisch immunmodulierte Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) bei jungen Erwachsenen [1]. Die Krankheit nimmt in den meisten Fällen einen chronisch-progredienten Verlauf, wobei es zu einer Minderung der Lebenserwartung im Vergleich zur Normalbevölkerung kommt [2]. Diese resultiert aus der Erkrankung selbst, aber auch aus deren Komplikationen, wie Infektionen in Folge von neurologischen Einschränkungen [3]. MS manifestiert sich bevorzugt zwischen dem 20.-40. Lebensjahr und tritt nur in sehr seltenen Fällen vor dem 10. oder erst nach dem 60. Lebensjahr auf [4]. Frauen erkranken zwei- bis dreimal häufiger an der schubförmig-remittierenden MS (RRMS) als Männer, wobei in den letzten Jahrzehnten ein Trend in Richtung einer steigenden Inzidenz bei Frauen zu verzeichnen ist [5]. Die Erkrankungshäufigkeit weist weltweit, u.a. in Abhängigkeit von der geografischen Lage, große regionale Unterschiede auf. Man stellte fest, dass mit zunehmender Entfernung vom Äquator in Richtung beider Pole die Inzidenz und Prävalenz der MS steigt [6]. Durch Kurtzke (2000) [7] wurden anhand von regionalen Prävalenzen Risikoklassifikationen für Regionen aufgestellt. Hiernach zählen beispielsweise Nordamerika, Nordeuropa, Südostaustralien sowie Neuseeland zu den Hochrisikogebieten und Asien sowie Afrika zu den Gebieten mit niedrigem Risiko [7]. Das Lebenszeitrisiko, an MS zu erkranken, wird in der Normalbevölkerung von Hochrisikogebieten auf ca. 0,1-0,2% geschätzt [8]. In Deutschland geht man von etwa 120000 erkrankten Personen aus [1]. Auch die ethnische Herkunft scheint eine wichtige Rolle zu spielen, da unter den verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedliche Prävalenzen und Verlaufsformen der MS beschrieben wurden [9].

1.1.2. Ätiologie, Pathologie und Pathogenese

Die genauen Vorgänge bei der Ätiologie und Pathogenese der MS sind noch immer unklar. Man geht jedoch von einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen, wobei neben genetischen auch exogene sowie immunologische Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen.

1.1.2.1. Genetische Faktoren

Wichtige Punkte, die aus epidemiologischer Sicht für einen genetischen Hintergrund sprechen, sind die familiären Häufungen, Konkordanzen der Krankheit bei Zwillingen, das erhöhte Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades sowie das fehlende erhöhte Risiko bei adoptierten Kindern im Vergleich zur Normalbevölkerung [10]. Schon in den 70er Jahren wurden Assoziationen zwischen dem MS-Risiko und Genen des *Major Histocompatibility Complex* (MHC, deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex) der Klasse II auf dem Chromosom 6 nachgewiesen [11]. Diese Gene sind durch eine Vielfalt an Polymorphismen in der Bevölkerung gekennzeichnet, woraus eine Vielzahl an verschiedenen sogenannten humanen Leukozytenantigen (HLA)-Typen mit unterschiedlich hohen MS Risiken resultieren. Der bei den Nordeuropäern stark verbreitete Typ HLA-DR15+DQ6 wurde mit einem hohen Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht, wobei insbesondere der Genotyp HLA-DRB1*1501 eine zentrale Rolle spielt. Dieser Genotyp scheint das Erkrankungsrisiko auf das Dreifache zu erhöhen [12]. HLA-Typen sind jedoch weder notwendig noch ausreichend für die Entwicklung einer MS [12]. In Genom-weiten Assoziationsstudien [13] wurde deshalb nach *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (Einzelnukleotid-Polymorphismen) in nicht-MHC-Genen gesucht, welche zum MS-Risiko beitragen könnten. Dabei fielen besonders SNPs in den Rezeptoren von Interleukin 2 und 7 (IL2 und IL7) auf, welche wichtige Rollen in der Funktion von T-Zellen spielen [14]. Auch SNPs anderer Gene, die das Immunsystem beeinflussen, z.B. STAT3 [15], wurden auf diese Weise mit MS in Verbindung gebracht. Es ist aber zu betonen, dass sich die Entstehung der MS nicht allein durch genetische Aspekte erklären lässt. So erhöhen MS-assoziierte SNPs das Erkrankungsrisiko jeweils gerade einmal um ca. 10-30% [13]. Offensichtlich spielen bei der Ätiologie auch exogene Faktoren eine wichtige Rolle.

1.1.2.2. Exogene Faktoren

Für die Theorie, dass Umweltfaktoren wesentlich zur Entwicklung von MS beitragen, sprechen z.B. die 70-75% Diskordanz bei monozygoten Zwillingen [10], die Angleichung des Risikos bei Migration sowie die geografischen Unterschiede in Inzidenz und Prävalenz [7]. Die mit der Entfernung eines Landes zum Äquator einhergehende steigende Inzidenz lässt auf einen Einfluss von Sonnenlicht schließen [6]. In Studien wurde gezeigt, dass Personen mit hoher Sonnenexposition im Kindesalter ein verringertes MS-Risiko aufweisen [16], welches u.a. durch die immunsuppressive Wirkung von UV-Strahlung erklärt wird [17]. Aber auch Vitamin-D, dass durch UV-Licht in der Haut aktiviert wird und als ein Modulator von T-Zellen und dem Immunsystem beschrieben wird [18], ist in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Sowohl hohe Vitamin-D-Konzentrationen im Serum als auch eine Vitamin-D-reiche Ernährung könnten das Erkrankungsrisiko positiv beeinflussen [19]. Wahrscheinlich hat die

Vitamin-D-Konzentration im Serum einer schwangeren Frau Einfluss auf das MS-Risiko des Kindes, da Studien zeigen konnte, dass im Mai geborene Kinder, bei denen ein Großteil der Schwangerschaft im Winter durchlaufen wurde, eher an MS erkranken als Novemberkinder [20]. Weitere Faktoren, welche das MS-Risiko erhöhen und somit auch ätiologisch eine Rolle spielen könnten, sind Übergewicht in der Jugend [21] sowie Rauchen [22]. Im Rahmen der Infektions-Hypothese wurden zudem zahlreiche pathogene Erreger im direkten kausalen Zusammenhang mit MS diskutiert. Besonders das Masernvirus [23], Herpes Simplex Virus [23], Epstein-Barr-Virus (EBV) [24], Humanes Herpes Virus 6 [25], aber auch Bakterien wie *Hämophilus influenzae* [26] wurden vielfach als Risikofaktoren untersucht. Ganz besonders EBV stand in letzter Zeit bei vielen Studien im Fokus der Betrachtung [24]. Allerdings gibt es bis heute für keinen der genannten Erreger einen nachgewiesenen kausalen Zusammenhang zur Ätiopathogenese [27].

1.1.2.3. Autoimmunität

Häufig wird die MS als eine Autoimmunkrankheit diskutiert. Für diese Annahme sprechen u.a. die Präsenz von aktivierten, autoreaktiven T-Zellen, erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen im Liquor bei MS-Patienten sowie das Ansprechen auf immunmodulatorische Therapien [28]. Außerdem bestehen histologisch und immunologisch große Ähnlichkeiten mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, bei welchem eine Immunisierung entweder aktiv durch Myelin-Antigengabe oder passiv durch Transfer von autoreaktiven T-Zellen induziert wird [29]. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Theorien über die Auslösung des autoimmunen Prozesses bei MS aufgestellt. Zum Beispiel diskutiert die Hygiene-Hypothese, dass Personen, welche im frühen Kindesalter reduziert pathogenen Keimen ausgesetzt waren und in der Bevölkerung verbreitete Infektionen nicht durchlaufen haben, eher an Autoimmunkrankheiten einschließlich MS erkranken als Personen mit frühkindlicher Exposition [30]. Dies könnte eventuell an den unterschiedlichen Entwicklungsständen, in denen sich die Immunsysteme bei beiden Personengruppen befinden, liegen [31]. Bei dem sogenannten *Bystander* (deutsch: Zuschauer)-Effekt wird angenommen, dass peripher autoreaktive T-Zellen bei Infektionen unspezifisch durch Zytokine, Superantigene oder *Toll-like-Rezeptoren* stimuliert werden [32]. Bei lokalen Gewebeschädigungen durch Erreger oder Immunantworten kann es dann zur Freisetzung und HLA-vermittelten Präsentation weiterer Autoantigene kommen, wodurch es zur spezifischen Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen kommen könnte [32]. Unter der Theorie des molekularen Mimikry versteht man, dass Immunzellen oder Antikörper nach einer Infektion eine Kreuzreaktion zwischen Fremdantigen des Pathogens und einem körpereigenen Antigen zeigen [33]. Das hat zur Folge, dass körpereigene Strukturen nachfolgend angegriffen werden können. Eine solche Kreuzreaktion wird z.B. zwischen EBV-Proteinen und Myelin-Antigenen bei MS-Patienten vermutet, so dass es zur Demyelinisierung von Axonen kommen könnte [34].

1.1.2.4. Pathologie und Pathophysiologie

Die MS ist eine chronisch entzündlich ablaufende Erkrankung des ZNS, welche primär zur Demyelinisierung und zu Axonschädigungen von Nerven führt [35]. Durch diesen Prozess kommt es zur Verlangsamung bzw. Unterbrechung der Erregungsleitung sowie zu Spontan-Depolarisationen entlang der Nervenfasern. Dies führt zu den heterogenen neurologischen Symptomen, die bei MS-Patienten auftreten [36]. Die MS ist initial in der Regel durch unvorhersehbare Schubereignisse mit Remissionen unterschiedlicher Ausprägung und der Progression von Behinderungen gekennzeichnet [37]. Die Schübe werden als klinischer Ausdruck von akuten Entzündungsprozessen mit Demyelinisierungen im ZNS gewertet, wohingegen fortschreitende Behinderungen die chronische Demyelinisierung, Gliosis und axonalen Verluste widerspiegeln [35].

Durch die Demyelinisierungen, welche in Herden an mehreren Stellen gleichzeitig und bevorzugt in der weißen Substanz stattfinden, entstehen als Plaques bezeichnete Läsionen. Prädispositionsstellen für Plaques sind insbesondere Rückenmark, Kleinhirn, Stammhirn, Sehnerven sowie die periventrikulären Bereiche im Gehirn [38]. Nach einiger Zeit kommt es zur Vermehrung von Astrozyten in den Plaques, was zur Ausbildung von gliotischen Narben führt (Gliosis) [35]. Es wird zwischen akut aktiven und chronischen Herden unterschieden [39]. Bei akut aktiven Läsionen, bei denen der Prozess der inflammatorischen Demyelinisierung im Vordergrund steht, ist das histologische Bild vorrangig durch perivaskuläre Infiltrate, bestehend aus CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und Monozyten gekennzeichnet [40]. Auch in den frühen akut aktiven Läsionen können sich durch inflammatorische Prozesse hervorgerufene, axonale Degenerationen befinden [41]. Die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist durch inflammatorische Prozesse eingeschränkt, wodurch entzündliche Infiltrate ins ZNS Parenchym eindringen können [40]. Bei chronischen Läsionen dominieren neben Demyelinisierungen vor allem Axon-Degenerationen das Bild, wobei neben T-Zellen vermehrt Mikroglia sowie Plasmazellen zu finden sind [40]. Während eine Remyelinisierung von Axonen zu einem gewissen Grad stattfinden kann, sind Axon-Degeneration und Nervenverlust irreversible Prozesse, die Einfluss auf bleibende neurologische Schäden und auf die Progression der Krankheit haben [35]. Mit dem Fortschreiten der Krankheit nimmt der Grad der Remyelinisierung ab [42]. Obwohl bevorzugt die weiße Substanz befallen wird, können auch die graue Substanz vom Kortex und den tiefen Kerngebieten von Läsionen betroffen sein. Hier steht vor allem der Nervenverlust und die Axon-Degeneration im Vordergrund, wohingegen entzündliche Infiltrate seltener zu finden sind [43, 44].

Man vermutet, dass Myelin- und Axonschäden durch verschiedene Mechanismen entstehen, z.B. durch den Einfluss von T-Zellen, pro-inflammatorischen Zytokinen, Myelin-verdauenden Makrophagen, Antikörpern, Komplementfaktoren oder Radikalen [45]. Die genauen Abläufe,

welche sich bei der Pathogenese abspielen, sind aber trotz vieler Untersuchungen weiterhin unbekannt. Es wird angenommen, dass es zur peripheren Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen kommt, welche mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und Matrix-Metallo-Proteasen über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen. Dort werden sie vermutlich durch Antigen-präsentierende Zellen reaktiviert und führen zur Anlockung weiterer Immunzellen [46].

Die exakte Rolle die B-Zellen in der MS-Pathogenese einnehmen ist noch immer weitgehend unklar. Bei einigen MS-Patienten wurden *post mortem* follikelartige Ansammlungen von B-Zellen in den Hirnhäuten gefunden. Auch der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor sowie ein pathologischer Immunglobulin G (IgG) Index, welche auf eine intrathekale IgG Synthese hinweisen, deuten auf eine zentrale Beteiligung dieses Zelltyps im Krankheitsprozess der MS [47]. T-Zellen werden in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt. Zu den CD4+ Subtypen zählen Typ1-T-Helfer (TH1)-Zellen, Typ2-T-Helfer (TH2)-Zellen, Typ17-T-Helfer (TH17)-Zellen und regulatorische T (Treg)-Zellen [48]. Ursprünglich wurde den TH1-Zellen, die proinflammatorische Zytokine ausschütten, die Hauptrolle in der MS-Pathogenese zugesprochen [49]. TH2-Zellen sind für die Verstärkung der humoralen Immunantwort verantwortlich und produzieren anti-inflammatorische Zytokine [27]. Eine Dysbalance zwischen beiden Zelltypen wurde in Verbindung mit MS diskutiert [27]. Bei den TH17-Zellen handelt es sich um einen relativ neu entdeckten CD4+ Subtyp, welcher durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist. Da TH17-Zellen außerdem über neurotoxische Aktivitäten verfügen und vermehrt in aktiven Läsionen sowie im Liquor von MS-Patienten auftreten, sind sie in das wissenschaftliche Interesse im Kontext der MS-Pathogenese gerückt [50]. Treg-Zellen dienen der Unterdrückung peripher aktivierter autoreaktiver T-Zellen, deren Apoptoseinduktion und auf diese Weise der Verhinderung immunmediierter Prozesse [51]. Bei einigen MS-Patienten konnte eine insuffiziente Funktion dieser Zellen nachgewiesen werden [51].

Insgesamt sind die ablaufenden Prozesse in der Pathogenese, deren Reihenfolge und Aufrechterhaltung sowie die Rollen der einzelnen Immunzell-Subtypen noch relativ unverstanden und bedürfen weiterer Studien.

1.1.3. Verlaufsformen und Krankheitssymptome

Multiple Sklerose ist sowohl pathologisch als auch klinisch eine heterogene Erkrankung, deren individueller Verlauf schwer vorherzusagen ist. Das Ausmaß und die Art der Symptome hängen stark von der Lokalisation der Entzündungs- und Degenerationsprozesse sowie von der Verlaufsform der Krankheit ab [52]. Es scheint aber, dass Frauen und junge Patienten zu einem langsameren Progress der Krankheit neigen als Männer und ältere Patienten [53]. Etwa 80% der Patienten, welche an einer klinisch manifesten schubförmig-remittierenden MS erkranken, stellen sich primär mit einer isolierten Episode eines zentral-neurologischen Symptoms vor, welches

zunächst keiner spezifischen Ursache zugeordnet werden kann [54]. Diese Episode wird klinisch isoliertes Syndrom (KIS) genannt und geht häufig mit Paresen, Sehestörungen oder sensorischen Störungen einher [54]. Ab der zweiten Episode wird von einer klinisch manifesten MS gesprochen. Die schubförmig-remittierende MS (RRMS), die initial mit bis zu 90% die häufigste Form darstellt, ist von Episoden mit neu auftretenden Symptomen und deren voll- oder unvollständiger Rückbildung gekennzeichnet [4]. Als ein Schub wird das über 24 Stunden anhaltende Auftreten neuer Symptome oder Verschlechtern eines bestehenden Symptoms definiert, das nicht anderweitig erklärbar ist und bei dem der Beginn des letzten Schubes mindestens 30 Tage zurückliegt [55]. Die Frequenz der Schübe sowie die Vollständigkeit der Rückbildung nehmen oft mit der Krankheitsdauer ab [37]. Es wird vermutet, dass die RRMS durch zwei Phasen gekennzeichnet ist. In der ersten Phase scheinen fokale Entzündungsprozesse im ZNS den Grad der Behinderung stark zu beeinflussen, wohingegen die Progression der Behinderung nach Übergang in eine zweite Phase unabhängig von Entzündungsprozessen fortschreitet [56]. Bei 70-80% der RRMS-Patienten geht der Krankheitsverlauf nach durchschnittlich 19 Jahren [57] in eine sekundär progressive Form (SPMS) über, welche sich entweder durch kontinuierliche Zunahme des Behinderungsgrades ohne klinisch erkennbare Schübe oder durch einen progressiv schubförmigen Verlauf mit unvollständiger Symptom-Rückbildung bemerkbar macht (Abb. 1) [58]. Etwa 15% der MS-Patienten leiden an der prognostisch ungünstigeren primär progressiven Form (PPMS), die bereits von Krankheitsbeginn an durch das Fehlen von Schüben und einer kontinuierlichen Verschlechterung des neurologischen Zustandes der Patienten gekennzeichnet ist [58]. Für diese Form der MS ist die fortschreitende Entwicklung von spastischen Paraparesen typisch [59]. Bei sehr wenigen dieser Patienten sind auf die primäre Progression zusätzlich Schübe aufgesetzt, deren Rückbildung voll- oder unvollständig sein kann (Abb. 1) [58].

Die Heterogenität der MS zeigt sich vor allem in interindividuell unterschiedlichen Symptomen. Die individuelle Prognose eines Patienten kann durch den heterogenen Krankheitsverlauf auch innerhalb des selben Subtyps schlecht vorhergesagt werden [37]. Zu den häufigsten Symptomen gehören Ataxie, Blasendysfunktionen, Depression, Dysarthrie, Fatigue, kognitive Beeinträchtigung, okulomotorische Störungen, Paresen, Schmerz, sexuelle Dysfunktion, Spastiken, Tremor und Verdauungsstörungen. Insbesondere Depression, Fatigue und kognitive Beeinträchtigungen, welche schon in frühen Krankheitsstadien auftreten können, haben einen großen Einfluss auf die Lebensqualität von Patienten [36, 38]. Weitere charakteristische Phänomene, sind das Lhermitte-Zeichen (bei Kopfbeugung treten Parästhesien entlang der Wirbelsäule und den Extremitäten auf) und das Uhthoff-Phänomen (vorübergehende Verschlechterung der Symptome bei Erhöhung der Körperkerntemperatur) [60]. Neben der „klassischen“ MS existieren Sonderformen, wie die diffuse zerebrale Sklerose, die konzentrische Sklerose Baló, die MS vom Typ Marburg sowie die Neuromyelitis optica (NMO) [61].

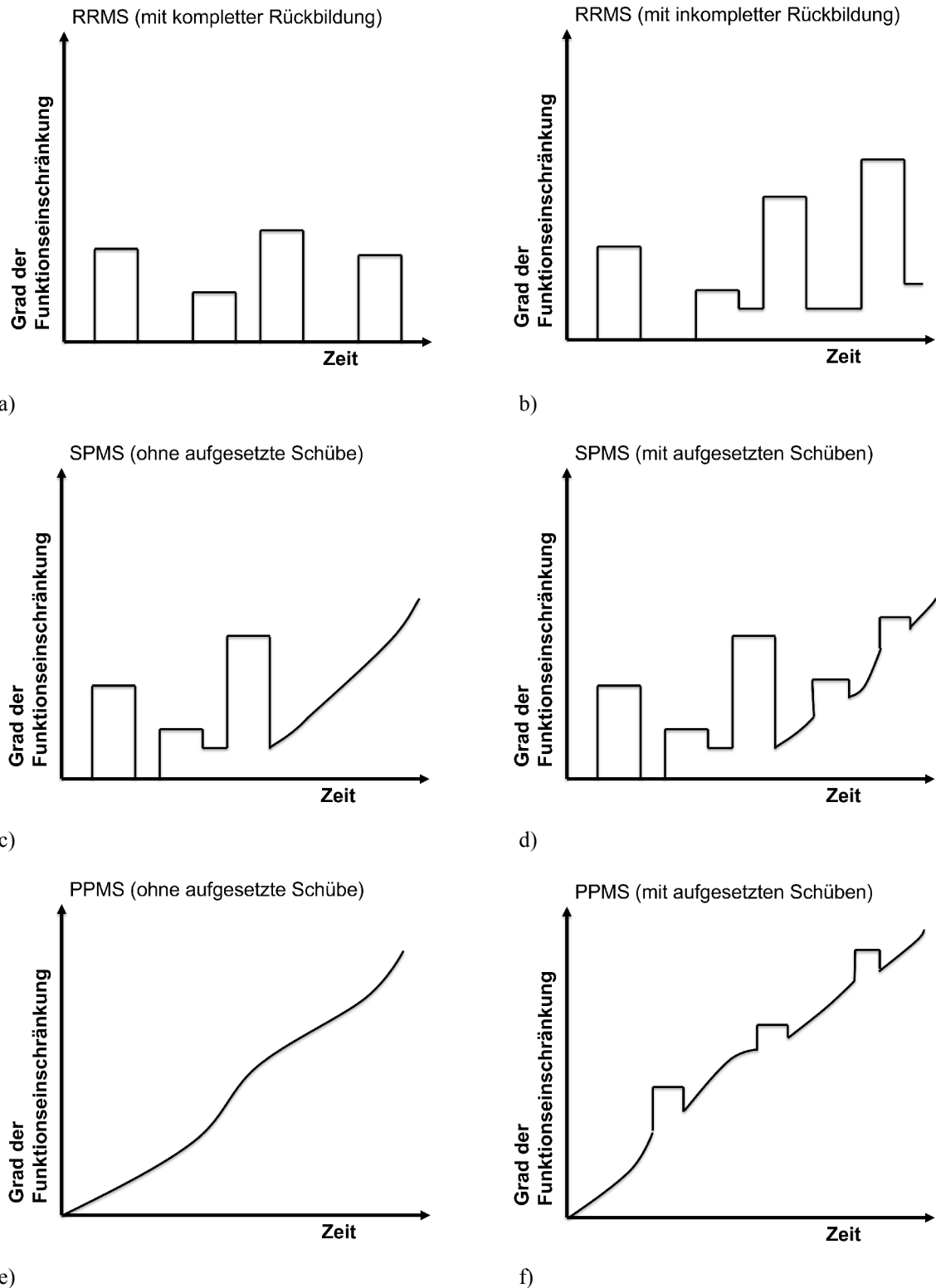


Abb. 1: Verlaufsformen der MS (mod. nach [58]). Dargestellt sind 6 Hauptverlaufsformen der MS. Die Schübe bei der RRMS können sich sowohl vollständig zurückbilden (a), als auch bleibende Funktionseinschränkungen verursachen (b). Die SPMS kann mit (c) oder ohne aufgesetzte Schübe ablaufen (d). Bei der PPMS, die von Beginn an progredient verläuft (e), können sich selten Schübe aufsetzen (f).

RRMS= schubförmig-remittierende MS; SPMS= sekundär progressive MS; PPMS= primär progressive MS.

1.1.4. Diagnose und Krankheitsscores

1.1.4.1. Diagnosekriterien

Um bei MS eine effiziente Therapie einleiten zu können, bedarf es einer schnellen und zuverlässigen Diagnose. Diese kann oft anhand der klinischen Präsentation vermutet werden und wird durch paraklinische Methoden, wie der Magnetresonanztomographie (MRT) als Bildgebung, Liquoruntersuchungen und elektrophysiologische Untersuchungen gesichert [62]. Im MRT sind bei über 95% der MS-Patienten Veränderungen in der weißen Substanz zu sehen [37]. Zur weiteren diagnostischen Abklärung werden häufig evozierte Potentiale herangezogen, um versteckte Demyelinisierungen anhand der verlangsamten Erregungsleitung nachzuweisen [63]. Bei über 90% der Patienten zeigen sich in der Proteinelektrophorese des Liquors oligoklonale Banden [64]. Daneben sind häufig erhöhte Immunglobulin G Konzentrationen (IgG-Index), eine lymphozytäre Pleozytose und eine positive Masern-Röteln-Zoster-Reaktion im Liquor zu finden [62]. Als besonders wichtig wird die räumliche und zeitliche Dissemination der klinischen Symptome und der Veränderungen in der Bildgebung des ZNS angesehen.

Die McDonald-Kriterien sind die weltweit am häufigsten angewandten Kriterien zur Diagnosestellung (Tab. 1) [62], welche in der Vergangenheit regelmäßig überarbeitet und an neue wissenschaftliche Erkenntnisse angepasst wurden. Vor der definitiven Diagnosestellung müssen andere mögliche Erkrankungen ausgeschlossen werden, da eine Vielzahl von Krankheiten die MS typischen Erscheinungen im MRT oder Symptome imitieren können. Zu den Differentialdiagnosen zählen u.a. Autoimmunkrankheiten (z.B. Systemischer Lupus erythematosus, Sarkoidose), Infektionskrankheiten (z.B. Neuroborreliose, Syphilis), ischämische Läsionen, Neoplasien, Stoffwechselkrankheiten (z.B. Leukodystrophien, Morbus Fabry) sowie eine Vielzahl weiterer Erkrankungen [62].

Tab. 1: Diagnose der RRMS nach den überarbeiteten McDonald-Kriterien von 2010 [62]

Klinische Vorstellung	Zusatzdiagnostik
≥ Zwei klinische Schübe und klinisch objektivierbarer Nachweis von ≥ zwei Läsionen oder objektivierbarer Nachweis von einer Läsion und anamnestisch bekanntem Schubereignis	Nicht notwendig
≥ Zwei Schubereignisse und klinisch objektivierbarer Nachweis von einer Läsion	<u>Nachweis der örtlichen Dissemination durch:</u> ≥ eine T2 Läsion im MRT in ≥ zwei MS-typischen Regionen (spinal, periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell) oder Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation an einem anderen Ort
Ein Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis von ≥ zwei Läsionen	<u>Nachweis der zeitlichen Dissemination durch:</u> Nachweis von asymptomatisch Gadolinium-anreichernden und nicht anreichernden Läsionen im MRT oder neue T2- und/oder Gadolinium-anreichernde Läsion im Kontroll-MRT oder Nachweis eines zweiten klinischen Ereignisses
Ein Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis von einer Läsion	<u>Nachweis der örtlichen Dissemination durch:</u> ≥ eine T2 Läsion im MRT in ≥ zwei MS-typischen Regionen oder Nachweis einer klinischen Manifestation an einem anderen Ort und <u>Nachweis der zeitlichen Dissemination durch:</u> gleichzeitigen Nachweis von asymptomatisch Gadolinium-anreichernden und nicht anreichernden Läsionen im MRT oder neue T2- und/oder Gadolinium-anreichernde Läsion im Kontroll-MRT oder Nachweis eines zweiten klinischen Ereignisses

1.1.4.2. Etablierte Scores zur Einschätzung des Schweregrades der Krankheit

Um den natürlichen klinischen Verlauf und Therapieerfolge bei MS-Patienten beurteilen zu können, wurden verschiedene Methoden zur Messung des Grades der Einschränkung und Behinderung entwickelt. Die durch Kurtzke eingeführte *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) [65] ist der am weitesten verbreitete und am häufigsten angewandte *Score* zur Einstufung der Einschränkungen bei MS. Die von 0 bis 10 Punkten reichende Einteilung basiert auf einer ordinalen Skalierung mit einem halben Punkt Schritintervall (außer zwischen 0 und 1). Der EDSS berücksichtigt die neurologische Beeinträchtigung in 8 verschiedenen Funktionssystemen (Blase, Hirnstamm, Kleinhirn, Pyramidenbahn, Sensorik, Verdauungssystem, visuelles System und zerebral kognitive Funktion), welche durch eine klinische Untersuchung subjektiv bewertet werden. Zusätzlich geht die klinische Präsentation des Patienten in die Bewertung ein. Ein Wert von 0 steht für einen neurologischen Status ohne Defizite, ein Wert ab 4 signalisiert Einschränkungen in der Gehfähigkeit, bei Werten ab 6 werden Gehhilfen benötigt und ein Wert

von 10 steht für einen MS-bedingten Tod. Der *Score* ist allerdings wenig sensitiv für Defizite aus dem Bereich der Neuropsychologie oder des Vegetativums. Um den EDSS zu ergänzen, wurde der *Multiple Sclerosis Functional Composite* eingeführt (MSFC) [66]. Dieser besitzt eine kontinuierliche Skalierung und korreliert gut mit MRT-Veränderungen sowie mit dem EDSS. Bei diesem *Score* werden die 3 Komponenten Gehstrecke (mittels *Timed 25-Foot Walk Test*), Armgeschicklichkeit (mittels *9-Hole Peg Test*) und kognitive Leistung (mittels *Paced Auditory Serial Addition Test*) beurteilt.

1.1.5. Therapie

Für MS existieren bis heute keine kurativen Therapien und die etablierte multimodale Therapie zielt vor allem darauf ab, die Lebensqualität der MS-Patienten zu verbessern. Zum einem gehört zu dem Konzept der MS-Behandlung, neben medikamentösen und nicht-medikamentösen symptomatischen Therapien, die kausalerorientierte immunmodulatorische Therapie. Diese soll dazu beitragen akute Schübe abschwächen und zu verkürzen sowie den Krankheitsverlauf zu modulieren [67]. Außerdem ist es wichtig, dem Patienten psychologische bzw. sozialmedizinische Unterstützung anzubieten [68] sowie dem Patienten Strategien zur Krankheitsbewältigung zu vermitteln (Coping) [69], da die Diagnose MS zu erheblichen sozialen, emotionalen, familiären und beruflichen Belastungen führen kann. Im Folgenden wird jedoch der Schwerpunkt auf die kausalerorientierte Therapie gesetzt.

Für die Modifikation des Krankheitsverlaufes werden immunmodulatorische Medikamente eingesetzt. Diese Medikamente sind besonders in den Anfangsstadien der Erkrankung effektiv, da sie auf die inflammatorische Komponente der MS abzielen, deren Einfluss jedoch nach heutigem Wissensstand im chronischen Verlauf der Krankheit abnimmt [56], weswegen ein frühzeitiger Beginn der Therapie wichtig für ein effektives Resultat ist. Um die Krankheit dem Verlauf angemessen zu therapieren, hat die Deutsche Gesellschaft für Neurologie Leitlinien als Empfehlung für die Behandlung von MS-Patienten herausgegeben (Tab. 2) [70]. In diesem Kapitel wird vornehmlich auf die Interferon-beta-Therapie bei MS-Patienten eingegangen. Weitere immunmodulatorische Medikamente, die Anwendung in der MS-Stufentherapie finden, können Tab. 2 entnommen werden.

Tab. 2: Stufentherapie der Multiplen Sklerose (mod. nach [70])

Indikation	KIS		RRMS	SPMS	
Verlaufsmodulierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		2. Wahl Mitoxantron (CPM) 1. Wahl Alemtuzumab Fingolimod Natalizumab	Mit Schüben	Ohne Schübe
	Milde / moderate Verlaufsform	Glatirameracetat IFN-beta-1a i.m. IFN-beta-1a s.c. IFN-beta-1b s.c.	Dimethylfumarat Glatirameracetat IFN-beta-1a i.m. IFN-beta-1a s.c. IFN-beta-1b s.c. Teriflunomid (Azathioprin) (IVIg)	IFN-beta-1a s.c. IFN-beta-1b s.c. Mitoxantron (CPM)	Mitoxantron (CPM)
Schubtherapie	2. Wahl Plasmapherese 1. Wahl Methylprednisolonpuls				

Die Reihenfolge der Präparate wurde nach alphabetischer Reihenfolge gewählt und impliziert keine Überlegenheit eines Medikamentes.

CPM= Cyclophosphamid; IFN-beta= Interferon-beta; i.m.= intramuskulär; IVIg= Intravenös applizierte Immunglobuline; KIS= klinisch isoliertes Syndrom; RRMS= schubförmig-remittierende Multiple Sklerose; s.c.= subkutan; SPMS= sekundär progrediente Multiple Sklerose; ()= Unter Einschränkungen empfohlen.

Die natürlich im Organismus produzierten Interferone dienen u.a. der Abwehr von viralen Erregern [71]. Es werden Typ I (Interferon-alpha und Interferon-beta) von Typ II Interferonen (Interferon-gamma) unterschieden [71], wobei in der MS-Therapie nur Interferon-beta (IFN-beta) Anwendung findet. Dieses Zytokin wird bei der MS in drei verschiedenen Formen eingesetzt [72]. Das Präparat IFN-beta-1a wird entweder dreimal die Woche subkutan (s.c. 22µg oder 44µg) als Rebif® oder einmal die Woche intramuskulär (i.m. 30µg) als Avonex® gespritzt, wohingegen IFN-beta-1b (Betaferon®) alle zwei Tage subkutan (s.c. 250µg) verabreicht wird [67]. Der Unterschied zwischen IFN-beta-1a und IFN-beta-1b besteht darin, dass es sich bei IFN-beta-1a um eine glykolisierte Form des natürlichen Interferons handelt, welches mit Hilfe von chinesischen Hamsteroarzellen hergestellt wird. IFN-beta-1b wird mit Hilfe von *Escherichia coli* Bakterien produziert, hat eine geringfügig veränderte Primärsequenz und ist nicht glykosyliert [72]. IFN-beta-1a zeigt eine höhere Wirkpotenz als IFN-beta-1b, weswegen IFN-beta-1b in einer höheren Dosierung als IFN-beta-1a verabreicht wird [73]. Die exakten Wirkmechanismen der IFN-beta-Therapie sind noch nicht genau aufgedeckt. Dennoch wurden unter Therapie bei einer Vielzahl von Genen, wie MX1, RSAD2, IL8 oder STAT1, Expressionsänderungen in Immunzellen beobachtet [74-77], weswegen sie folgend als IFN-beta-

responsive Gene bezeichnet werden. Es ist weiterhin bekannt, dass IFN-beta indirekt über die veränderte Genexpression als Immunmodulator fungiert, indem Antigenpräsentation, T-Zellproliferation sowie die Zytokin- und Chemokinexpression beeinflusst werden [78]. Zusätzlich wird auch die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen wie T-Zellen moduliert [78]. IFN-beta-1a und IFN-beta-1b sind sowohl zur Behandlung der RRMS mit moderatem Krankheitsverlauf als auch für die milde Verlaufsform des KIS zugelassen (Tab. 2). IFN-beta-1b s.c. und IFN-beta-1a s.c. werden außerdem zur Behandlung der SPMS mit aufgesetzten Schüben empfohlen [70]. Bei der Therapie kann die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern (NAK) gegen IFN-beta problematisch sein. Diese verhindern die Aktivierung des IFN-beta-Signalweges und schwächen somit den biologischen Effekt der Behandlung ab, was auch den individuellen Therapieerfolg mindern kann [79, 80]. Bei IFN-beta-1a i.m. entwickeln 5-10% der Patienten unter Langzeittherapie vorübergehend NAK, wohingegen dies bei 15-30% der Patienten unter IFN-beta-1a s.c. und IFN-beta-1b-Therapie beobachtet wurde [67]. Nach Absetzen der Therapie können diese Antikörper für mehrere Jahre persistieren [81].

Für die PPMS existieren bis heute keine evidenzbasierten immunmodulatorisch wirksamen Therapien. Der Fokus der Behandlung liegt hier auf der Behandlung bestehender Symptome, um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern [70].

1.2. MicroRNA

1.2.1. Biomarker

Die Heterogenität bei MS spiegelt sich nicht nur in der Pathologie und klinischen Phänomenologie, sondern auch im individuellen Therapieansprechen wider. Um möglichst schnell eine sichere Diagnose stellen zu können und eine effektive, individualisierte Therapie durchzuführen, könnte der Einsatz von Biomarkern hilfreich sein. Es besteht die Hoffnung mit ihrer Hilfe z.B. den möglichen Verlauf, das Stadium der Krankheit sowie die Wirksamkeit einer Therapie besser bestimmen bzw. vorhersagen zu können [82].

Biomarker sind objektiv messbare und auswertbare Indikatoren für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder aber auch für den Verlauf einer therapeutischen Intervention [83]. Neben der Untersuchung von biologischen Materialien, wie Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Liquor cerebrospinalis, Urin) und Geweben, werden bildgebende Verfahren (z.B. MRT, Computertomografie) oder neurophysiologische Untersuchungen (z.B. evozierte Potentiale) zur Identifikation und Bestimmung von Biomarkern eingesetzt [84]. In den biologischen Materialien können z.B. DNA, RNA, Proteine, Metabolite oder Zellen, wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), als Biomarker dienen [85]. Zu den häufig in RNA-Analysen bei MS-Patienten untersuchten PBMC zählen Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen) und Monozyten. Wichtig für die Anforderungen an einen Biomarker sind vor allem die einfache Handhabung, ein möglichst wenig invasives Vorgehen am Patienten sowie eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität des Markers [86]. Biomarker nehmen in der Medizin unterschiedliche Funktionen ein. Die „prädeteminierenden Marker“ helfen bei der Risikoabschätzung eines Individuums an einer bestimmten Krankheit zu erkranken. Hierbei spielt z.B. auch die genetische Suszeptibilität durch Polymorphismen oder Genvarianten eine Rolle. Diese Marker sind vor dem Ausbruch einer Krankheit vorhanden, sind meist aber weder notwendig noch ausreichend, um die Manifestation der Erkrankung erklären zu können. Marker, die mit dem Auftreten einer Krankheit korrelieren, bei denen aber kein kausaler Zusammenhang besteht, werden als Risikomarker bezeichnet, solche, bei denen ein kausaler Zusammenhang nachgewiesen wurde, als Risikofaktoren [86, 87]. Des Weiteren unterscheidet man die Gruppe der „krankheitsbezogenen Marker“. Dazu zählen u.a. die „*Screening*-Marker“, welche u.a. dem Nachweis von noch präklinischen Krankheitszuständen von Patienten dienen, die „*diagnostischen* Biomarker“, welche die Diagnosestellung unterstützen, die „*Staging*-Marker“, die der Einschätzung der Schwere einer Erkrankung oder deren Verlaufsbeurteilung dienen sowie die „*prognostischen* oder *prädiktiven* Marker“, die Hinweise über den möglichen Verlauf bzw. Ausgang einer Erkrankung oder das Ansprechen auf eine geplante therapeutische

Intervention geben [86, 87]. Bei der Therapie von Erkrankungen gibt es Biomarker (therapeutische Biomarker), die zwar eine biologische Wirkung der Therapie zeigen, aber nicht zwangsläufig mit dem Erfolg der Therapie korrelieren [84]. Therapeutische Biomarker, die in Studien erwiesen haben, dass ihre biologischen Effekte sehr eng mit klinischen Endpunkten (z.B. Wohlbefinden, Überleben, Funktionseinschränkungen) verknüpft sind, werden als Surrogatmarker bezeichnet [84].

Bei MS haben sich bisher nur wenige molekulare Biomarker im klinischen Alltag etablieren können. Dabei gibt es einige klinisch-demographische Parameter, die als prognostische Marker für einen günstigeren Krankheitsverlauf sprechen. Dazu zählen: weibliches Geschlecht, junges Alter bei der Erstmanifestation, optische Neuritis oder Sensibilitätsstörungen als Erstsymptom, komplette Rückbildung der Schübe und eine niedrige Schubfrequenz in den ersten Krankheitsjahren. Dahingegen zeigen Patienten mit männlichen Geschlecht, Kleinhirn- oder Bewegungsstörungen als Erstsymptom, inkompletten Schubrückbildungen, einer hohen Schubfrequenz und einer primär progressiven Form einen gehäuft schlechteren Verlauf [42]. Daneben existieren einige diagnostische Marker, z.B. der Nachweis von oligoklonalen Banden beim KIS für die Risikoabschätzung der Entwicklung einer manifesten MS [65] und der differential-diagnostische Nachweis von Aquaporin-4 Antikörpern bei der NMO [82]. Die Expressionslevel von CXCL13 spiegeln vermutlich die Krankheitsaktivität im Liquor und im Serum wider [88, 89] und könnten somit als Staging Marker der MS relevant sein. Als therapeutische Marker wurden in der Literatur insbesondere MX1, als Marker für die biologische Wirksamkeit der IFN-beta-Therapie [80], GPR3, als potentieller Marker zur Prognose des langfristigen klinischen Erfolges bzw. der Progression unter Therapie [90] sowie der Nachweis von NAK, bei dem mutmaßlichen Versagen einer IFN-beta-Therapie [82], diskutiert.

All diese Marker können allerdings nicht den individuellen Krankheitsverlauf oder das Therapieansprechen eines Patienten zuverlässig vorhersagen. Um den individuellen Krankheitsverlauf eines Patienten, die Krankheitsaktivität als auch die Effektivität einer Therapie besser abschätzen zu können sowie auch die Diagnosestellung bei MS zu verbessern, wäre die Identifizierung und Etablierung weiterer Biomarker wünschenswert. Seit einigen Jahren ist eine neue Klasse von RNA bekannt, die sogenannten microRNA (miRNA), welche schon bei vielen anderen Krankheiten als potentielle Biomarker diskutiert werden [91]. In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Expression bestimmter miRNA auch bei MS verändert sein kann, weswegen sie auch hier als zukünftige potentielle Biomarker in Betracht gezogen werden [92].

1.2.2. Überblick zu microRNA

1.2.2.1. Geschichte

miRNA sind kurze, einzelsträngige, nicht-proteinkodierende RNA-Moleküle, die typischerweise aus 21-22 Nukleotiden (Nt) bestehen und welche die Genexpression posttranskriptionell regulieren [93].

Die Geschichte der miRNA begann im Jahr 1993 als zwei Forschungsgruppen bei Genomuntersuchungen am Wurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) unabhängig voneinander entdeckten, dass das Gen *lin-4* kein Protein, sondern zwei kurze RNA kodiert, wobei die längere RNA (61nt) eine Vorläuferform der kürzeren RNA (21nt) zu sein schien [94, 95]. Die RNA zeigte einen hemmenden Einfluss auf die *messenger* RNA (mRNA) des Gens *lin-14* und beeinflusste auf diese Weise die Entwicklung des Wurmes im Larvenstadium. Da die kurzen *lin-4* RNA komplementäre Sequenzen zu einer Region in der *lin-14* mRNA aufwiesen, wurde angenommen, dass dem Regulationsmechanismus eine RNA-RNA-Interaktion zu Grunde liegen muss [94, 95]. Zunächst wurde dieser RNA-Form wenig wissenschaftliche Beachtung geschenkt, da man von einer Besonderheit im Entwicklungsstadium der Würmer ausging. Erst sieben Jahre später wurde in *C. elegans* eine zweite RNA dieser Art, welche durch das Gen *let-7* kodiert wird, entdeckt [96]. Genau wie *lin-4*, besitzt diese RNA eine Vorläuferform, ist 21nt lang und hemmt die mRNA eines Gens posttranskriptionell. Noch im selben Jahr wurde publiziert, dass *let-7* nicht nur in Würmern sondern im Genom vieler Organismen konserviert ist und somit regulatorisch wirken könnte [97]. Im Anschluss kam es durch das wachsende Interesse zur Entdeckung weiterer dieser RNA-Formen, die man auf Grund ihrer Kürze microRNA nannte [98]. Im Juni 2013 waren in der zentralen Datenbank miRBase [99] über 21.000 verschiedene reife miRNA zu 168 verschiedenen Spezies gelistet (weitere Informationen zu miRBase im Kapitel 1.2.4). Es wird vermutet, dass miRNA 1-5% der menschlich exprimierten Gene ausmachen und auf etwa 30% der proteinkodierenden Gene des Menschen regulatorisch wirken [100].

1.2.2.2. Biogenese und Regulation von microRNA

miRNA liegen im Genom sowohl innerhalb von klassischen Genen (intragenisch) als auch in den Bereichen dazwischen (intergenisch). Etwa die Hälfte aller miRNA liegt in Intron-Regionen von bekannten proteinkodierenden und nicht-proteinkodierenden Transkriptionseinheiten [101]. Wahrscheinlich werden die meisten dieser miRNA zusammen mit ihrem Wirtsgen reguliert und transkribiert, ohne dabei eigenständige Transkriptionseinheiten zu bilden [101]. Da miRNA allerdings auch intergenisch liegen können, scheinen auch eigenständig regulierte Vorläufer-Transkripte zu existieren [102]. Die Transkription wird auf Ebene von miRNA-Promotorelementen positiv und negativ beeinflusst, wobei, ähnlich wie bei proteinkodierenden

Genen, z.B. Transkriptionsfaktoren (TF) an die DNA in der Nähe des Transkriptionsstarts binden [103]. Weitere diskutierte Möglichkeiten der Transkriptionsregulation bestehen in der epigenetischen Chromatinmodifikation durch DNA-Methylierung oder Histonmodifikation [103].

Die Transkription der miRNA erfolgt mittels RNA Polymerase II, nach welcher das entstehende RNA-Transkript, ähnlich wie bei einer mRNA, einen 3' Poly-Adenosin-Schwanz und eine 5' 7-Methylguanosin-Kappe erhält. Diese erste Vorstufe der miRNA, welche *primary* miRNA (*pri-miRNA*) genannt wird, ist hunderte bis tausende Nukleotide lang und weist haarnadelförmige Faltungen auf [104]. Einige miRNA liegen im Genom sehr dicht beieinander, werden gemeinsam transkribiert und gehen aus einer gemeinsamen *pri-miRNA* hervor. Oftmals sind diese, als Cluster bezeichneten miRNA, eng miteinander verwandt und haben ähnliche Funktionen [98]. Die folgenden Reifungsstufen bis zur finalen miRNA sind durch das Mitwirken von Ribonuklease III (RNase III) und doppelsträngigen RNA-bindenden Proteinen (dsRBP) geprägt. Im Zellkern schneidet die RNase III Drosha im Zusammenspiel mit dem dsRBP DGCR8 ca. 70 nt lange, haarnadelförmig gefaltete Vorläuferformen namens *precursor-miRNA* (*pre-miRNA*) aus der *pri-miRNA* heraus (Abb. 2), wobei die eigentliche miRNA immer in den hoch-konservierten Stammregionen dieser Strukturen liegt [104]. Ein Spleißen des RNA-Transkriptes ist vorher nicht notwendig, kann aber vorkommen. In sehr seltenen Fällen geht eine *pre-miRNA* direkt aus dem Spleiß-Vorgang einer mRNA hervor [105]. Mittels Exportin 5 wird die *pre-miRNA* aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Hier setzt die RNase III Dicer gemeinsam mit dem dsRBP TRBP (*transactivator RNA binding protein*) einen etwa 21 Basenpaar langen miRNA-miRNA*-Duplex aus der *pre-miRNA* frei. Der Strang des Duplex, dessen 5'Ende thermodynamisch weniger stabil ist, wird als reife miRNA selektiert und mit dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) gepaart [104] (Abb.2). Der komplementäre miRNA* Strang degradiert, kann aber auch in einigen Fällen als zweite reife miRNA erhalten bleiben, welche ihre eigenen Zielgene reguliert [103].

Auf allen beschriebenen Ebenen der Biogenese kann es zur Beeinflussung der miRNA-Reifung und damit zu Regulationsprozessen kommen. Das bedeutet, dass die miRNA selbst unter posttranskriptioneller Kontrolle stehen [106]. Zum einen wurden Aktivatoren für die Drosha-vermittelte *pri-miRNA*-Verarbeitung im Zellkern beschrieben, welche die Reifung von miRNA fördern, z.B. die TF SMAD 1, 3 und 5 [103]. Auf der anderen Seite gibt es Faktoren, welche die Identifikation der *pri-miRNA* durch Drosha behindern, indem z.B. im Rahmen des sogenannten *RNA-Editing* in der Haarnadelstruktur der *pri-miRNA* einige Basen ausgetauscht werden. Auch bei der zytoplasmatischen Verarbeitung der *pre-miRNA* durch Dicer wurden diese Prozesse beobachtet [103]. Eine weitere Regulationsmöglichkeit der miRNA-Wirkung besteht auf Ebene der miRNA-mRNA-Interaktion, deren Effektivität durch bestimmte Moleküle beeinflusst werden kann [106].

1.2.2.3. Posttranskriptionelle Regulation durch microRNA

Der entstandene RISC-miRNA-Komplex lagert sich seiner Ziel-mRNA an und beeinflusst sie somit in ihrer Funktion (Abb. 2). Die meisten miRNA können an hunderte verschiedene Ziel-mRNA binden [107].

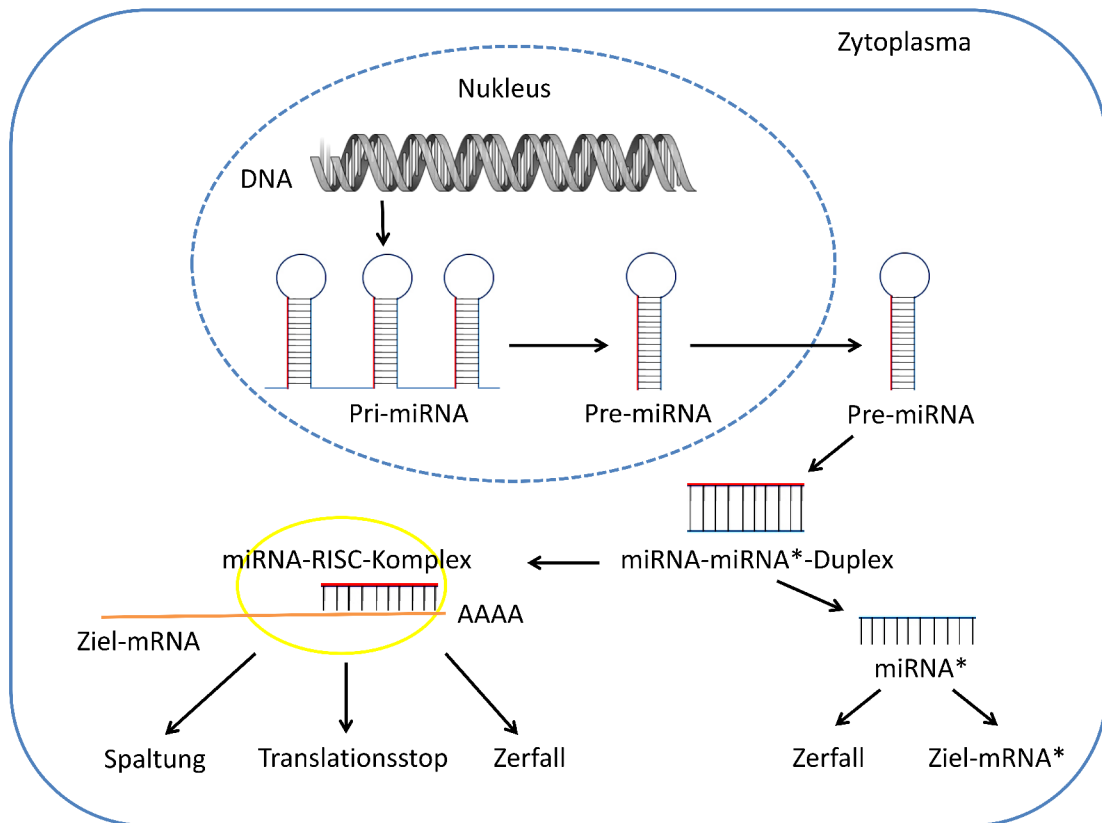


Abb. 2: Schema der microRNA-Biogenese und der Regulation von Ziel-mRNA durch microRNA in einer Zelle. Die Reifung der miRNA-Vorläuferstufen im Zellkern und im Zytoplasma stehen unter dem Einfluss von verschiedenen RNasen III und dsRBP. Die reife miRNA geht aus einem miRNA-miRNA*-Duplex hervor. Die reife miRNA bildet einen Komplex mit RISC, bindet an die Ziel-mRNA, spaltet diese bei perfekter Paarung oder führt bei nicht-perfekter Paarung zu deren Zerfall bzw. zu einem Translationsstop. Die miRNA* zerfällt oder reguliert eigene Ziel-mRNA.

AAAA= Poly-A-Schwanz der Ziel-mRNA; miRNA= reife microRNA; miRNA*= komplementärer Strang zur reifen microRNA; pri-miRNA= *primary* microRNA; pre-miRNA= *precursor* microRNA; RISC= *RNA induced silencing complex*; Ziel-mRNA*= Ziel-mRNA von miRNA*.

Eine mRNA ist aus mehreren Einheiten aufgebaut [108, 109]. Sie enthält u.a. die proteinkodierende Region, welche während der Translation in ein Protein übersetzt wird. Zusätzlich existieren Bereiche, die nicht übersetzt werden und deswegen untranslatierte Regionen (UTR) genannt werden. Einer dieser Bereiche befindet sich am 5'Ende der mRNA (5'UTR)

direkt vor dem kodierenden Bereich und enthält Bindungsstellen für Translationsfaktoren und für Ribosomen. Die 3'UTR liegt am 3'Ende und somit hinter dem kodierenden Bereich der mRNA [108, 109]. Es ist bekannt, dass in der 3'UTR der mRNA neben Bindungsstellen für regulierende Faktoren auch eine Vielzahl miRNA-Bindungsstellen vorhanden sind, an welche sich RISC-miRNA-Komplexe anlagern und ihre regulierende Funktion ausführen [108]. Obwohl in der 5'UTR und im kodierenden Bereich einiger mRNA miRNA-Bindungsstellen gefunden wurden, geht man davon aus, dass die meisten miRNA in der 3'UTR binden [104]. Ein Großteil der mRNA wird nicht nur von einer, sondern von vielen verschiedenen miRNA kontrolliert [110]. Bisher sind 3 Mechanismen bekannt wie miRNA ihre Ziel-mRNA beeinflussen [111].

Zum einen wirkt der RISC-miRNA-Komplex bei perfekter miRNA-mRNA-Basenpaarung als Endonuklease und schneidet die mRNA zwischen dem 10. und 11. Basenpaar in zwei Teile. Da eine perfekte Paarung nicht sehr häufig vorkommt, ist dieser Regulationsmechanismus eher selten zu finden [111]. Es wurde festgestellt, dass für eine effektive mRNA-Regulation die Paarung zwischen der miRNA und der mRNA nicht auf der gesamten Länge perfekt sein muss, sondern vielmehr die Komplementarität zwischen dem 2.-8. nt des 5' Endes der miRNA (*Seed-Region*) zu der 3'UTR der mRNA entscheidend ist.

Bei solchen nicht-perfekten miRNA-mRNA-Paarungen kommt es entweder zu einer Translationsinhibition oder zu einem induzierten mRNA-Zerfall [104]. Es ist noch nicht genau geklärt, auf welche Weise und auf welcher Ebene die Translationshemmung stattfindet. Es gibt aber Hinweise, wonach es zu einer Initiationshemmung der Translation, zur Elongationshemmung, zur ko-translationalen Proteindegradation oder zum vorzeitigen Translationsabbruch kommen kann [104, 112]. Die translationsgehemmten mRNA werden in Subkompartimente der Zelle, den sogenannten „*processing bodies*“ (P-bodies), gebracht, wo sie durch Enzyme degradiert werden. Auch hier findet sich ein Ansatzpunkt zur Regulation, da RNA-bindende Proteine unter bestimmten Umständen die mRNA ins Zytoplasma relokalisieren und die Translationshemmung rückgängig machen können [104].

Bei der mRNA-Destabilisierung durch miRNA werden Komponenten in der Zelle aktiviert, die zum Abbau des Poly-A-Schwanzes der mRNA führen. Zusätzlich kommt es zur Entfernung der 5' Kappe und am Ende zum Zerfall der mRNA [113]. Durch welchen Mechanismus festgelegt wird, ob es zu einem mRNA-Zerfall oder zur Translationshemmung kommt, ist unbekannt. Es wird außerdem diskutiert, ob der mRNA-Zerfall letztendlich keinen eigenständigen Mechanismus darstellt, sondern als sekundäre Folge der Translationshemmung zu betrachten ist [112].

Insgesamt können miRNA durch die posttranskriptionelle Genregulation Einfluss auf unterschiedliche biologische Prozesse, z.B. auf Zellproliferation, Apoptose, Zellzyklus, Differenzierungsprozesse, Migrationsprozesse und Stoffwechselvorgänge nehmen [113]. Wegen diesem potentiell großen Einfluss auf den Organismus wurden in den letzten Jahren vermehrt

Untersuchungen durchgeführt, die die Beteiligung von miRNA an verschiedenen Krankheiten überprüften [114-117].

1.2.3. Beteiligung von microRNA im Immunsystem und bei Krankheiten

Mit Hilfe des Mikroarray-basierten miRNA-Profilings wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen die miRNA-Expression von unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen gemessen wurde [118]. Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl der miRNA in verschiedenen Zellpopulationen in unterschiedlichen Maße exprimiert wird. Durch die verschiedenen, unterschiedlich hoch exprimierten miRNA in den Zellen und Geweben ergeben sich oft typische Expressionsmuster. Bei Krankheiten können diese Expressionsmuster verändert sein, indem bestimmte miRNA mehr oder weniger stark exprimiert werden [119]. Inzwischen wurden bei vielen Erkrankungen veränderte miRNA-Expressionsprofile entdeckt. Unter anderem wurde der Einfluss von miRNA auf die Krebsentstehung [114] und kardiovaskuläre Erkrankungen [115] untersucht. Aber auch bei autoimmunologischen Krankheiten, wie bei der MS [116] oder der rheumatoiden Arthritis [117], wurden veränderte miRNA-Expressionslevel beobachtet.

Auf das Immunsystem haben miRNA sowohl während der Hämatopoese als auch bei den peripheren Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen von Immunzellen einen großen Einfluss, wodurch sie zur Entstehung von Autoimmunität, Malignitäten und Immundefekten beitragen können [120-126]. Bei T-Effektor-Zellen tragen miRNA zur Differenzierung im Thymus einen entscheidenden Anteil bei. Zum Beispiel unterstützt das miR-17~92 Cluster (hsa-mir-17, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-20a und hsa-mir-92a-1) die Expansion sowohl von CD4+ [120] als auch von CD8+ T-Zellen [121]. Des Weiteren wurde postuliert, dass hsa-miR-181a-5p vor der Entstehung einer übermäßigen T-Zell-Anzahl schützt und sowohl negative als auch positive Selektion durch Erhöhung der Sensitivität des T-Zell-Rezeptors (TZR) begünstigt [120]. Bei naiven T-Zellen scheint hsa-miR-155-5p die Entwicklung zur TH1-Zelle zu fördern und die Sensitivität gegenüber Treg-vermittelter Hemmung zu verringern [122].

Auch bei B-Zellen wurde ein Einfluss der miRNA auf die Entwicklung und Differenzierung beschrieben. Das Cluster miR-17~92 und die miRNA hsa-miR-181a-5p tragen zur Zellproliferation, dem Überleben und der Differenzierung der B-Zellen im Knochenmark bei [123]. Die miRNA hsa-miR-150-5p spielt vermutlich eine Rolle bei der Hemmung der B-Zelldifferenzierung, weshalb sie in Vorläuferzellen in nur geringem Ausmaß exprimiert wird [123]. Für die Differenzierung von naiven B-Zellen und für die Fähigkeit später einen Ig-Klassenwechsel durchlaufen zu können, benötigen B-Zellen vermutlich die miRNA hsa-miR-155-5p [123].

Weitere miRNA, die eine Rolle bei der Hämatopoese spielen, sind die miRNA hsa-miR-223-3p, welche wichtig für die Granulopoese ist [124], sowie hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a-5p und hsa-

miR-106a-5p, welche mit der Monozytopoese assoziiert werden [125]. miRNA sind außerdem wichtig bei der Steuerung der Immunantwort auf Pathogene. Einige miRNA, wie. hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-155-5p oder hsa-miR-16-5p können in Monozyten bzw. dendritischen Zellen durch *Toll-like*-Rezeptor-Liganden und Zytokine, z.B. IFN-beta, aktiviert werden und nehmen dann Einfluss auf die Zytokinexpression in diesen Zellen [126, 127].

Bei MS konnten verschiedene miRNA in ihren Expressionsprofilen als verändert nachgewiesen werden. Beispielsweise sind in der Datenbank miR2Disease [128], welche Assoziationen von miRNA zu verschiedenen Krankheiten sammelt, insgesamt 4 Studien zu dieser Fragestellung gelistet. Bei diesen Studien von Keller *et al.* [129], Otaegui *et al.* [130], Du *et al.* [131] und Cox *et al.* [132] wurden insgesamt 16 verschiedene miRNA in Blutzellen von MS-Patienten als verändert exprimiert beschrieben (Kapitel 4.1.1). Waschbisch *et al.* (2011) [133] beobachteten als erste Forschungsgruppe miRNA-Expressionsänderungen unter einer immunmodulatorischen Therapie bei MS-Patienten und verdeutlichten, dass miRNA unter Umständen auch als therapeutische Biomarker bei MS in Betracht kommen. Das Potential der miRNA könnte u.a. in der individuellen Überwachung des Therapieverlaufes, z.B. durch Überprüfung der biologischen Wirkung einer Therapie, liegen. Hierzu Bedarf es jedoch noch weiterer intensiver Forschung und Validierung durch unabhängige Studien.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass miRNA sowohl in der Entwicklung und Funktion des Immunsystems als auch bei vielen pathologischen Zuständen eine zentrale Rolle zu spielen scheinen. Dies macht sie hinsichtlich der Frage interessant, inwieweit sie als diagnostische oder therapeutische Marker sowie als mögliche therapeutische Ziele genutzt werden können.

1.2.4. Überblick zu etablierten microRNA Datenbanken

Durch das zunehmende Interesse an miRNA wurde in den vergangenen Jahren durch viele verschiedene Forschungsgruppen eine große Vielfalt an miRNA-Daten gesammelt, deren quantitative und qualitative Aspekte stetig weiter steigen. Um die entsprechenden Daten und Informationen zu organisieren und aufzubereiten wurden unterschiedliche Datenbanken entwickelt, welche der Öffentlichkeit zur Verfügung stehen (Tab. 3). Diese Datenbanken zu nutzen, kann für Arbeitsgruppen sinnvoll sein, da auf effektive Weise, schnell wichtige Informationen extrahiert, verschiedene Daten verglichen oder eigene Ergebnisse mit Hilfe der Datenbanken überprüft werden können. Es ist durchaus sinnvoll schon vorhandene miRNA-Datensätze von anderen Forschungsgruppen zu nutzen und in die eigenen Forschungsarbeiten zu integrieren. Allerdings stellt es besonders für „Einsteiger“ eine Herausforderung dar, sich, bei der inzwischen hohen Anzahl an miRNA-Datenbanken und der großen Datenvielfalt, einen guten und schnellen Überblick zu verschaffen.

Tab. 3: Auswahl von microRNA-Datenbanken

Inhalte	Datenbank	Update	Internetadresse
Allgemeine miRNA-Charakteristika	miRBase [99, 134]	2014	mirbase.org
Transkriptionsstartpunkte von miRNA	miRStart [152]	2010	mirstart.mbc.nctu.edu.tw
TFBS für miRNA-Sequenzen im Genom	miRGen 2.0 [151]	2009	diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen
	MIR@NT@N [153]	2010	maia.uni.lu/mironton.php
SNPs in miRNA-Sequenzen	miRNASNP [154]	2011	bioguo.org/miRNASNP
Expressionsdatensätze von miRNA	miRDB [147, 148]	2012	mirdb.org/miRDB
	smirnaDB [150]	2009	www.mirz.unibas.ch/cloningprofiles
Literatur-basierte miRNA-Zielgene	miRecords [144]	2010	mirecords.biolead.org
	miRTarBase [136]	2011	mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw
	TarBase v5 [135]	2008	diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase
	TarBase v6 [155]	2012	microma.gr/tarbase
miRNA-Zielgen-Algorithmen	Diana microT v3 [140]	2009	diana.cslab.ece.ntua.gr/microT
	MicroCosm [142]	2007	ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm
	microRNA.org [143]	2010	microma.org/microma/home.do
	miRWalk [145]	2011	ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk
	PicTar [141]	2007	pictar.mdc-berlin.de
	TargetScan [139]	2012	targetscan.org
TF-miRNA-Zielgen-Rückkopplungen	CircuitsDB [156]	2012	biocluster.di.unito.it/circuits
Assoziation von miRNA zu Krankheiten	miR2Disease [128]	2008	mir2disease.org
	PhenomiR [146]	2011	mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir
	HMDD v2.0 [157]	2014	cuilab.cn/hmdd

Es sind nur einige Datenbanken beispielhaft aufgelistet, wobei die in dieser Doktorarbeit verwendeten Datenbanken farbig hervorgehoben sind. Es existieren Datenbanken, die Auskunft über allgemeine Informationen zu miRNA geben (z.B. miRBase), Datenbanken, die Algorithmen zur Berechnung potentieller Zielgene von miRNA anbieten (z.B. miRWalk oder PicTar) und Datenbanken, die Assoziationen zwischen miRNA und Krankheiten katalogisieren (z.B. miR2Disease). Daneben gibt es Datenbanken mit spezielleren Fragestellungen, z.B. zur potentiellen miRNA-Regulation durch TF (miRGen 2.0) oder zu bestimmten miRNA-Expressionsleveln in verschiedenen Geweben oder Zellen (smirnaDB).

TF= Transkriptionsfaktor; TFBS= TF-Bindestellen; Update= Jahr der letzten Aktualisierung.

Eine der zentralen Datenbanken, welche nicht nur allgemeine Informationen wie Literaturverweise, Sequenzen, Positionen im Genom, Vorläuferformen oder Cluster-Zugehörigkeiten von miRNA bietet, sondern zusätzlich als Sammelstelle für neue miRNA und deren Nomenklatur dient, ist miRBase [99, 134]. Sie wird regelmäßig aktualisiert, da durch z.B. *Deep Sequencing*-Technologien regelmäßig neue miRNA gefunden werden [134]. Die Nomenklatur einer miRNA erfolgt nach einem einheitlichen Schema, um Doppelbenennungen und Überlappungen zu vermeiden. Jede Spezies erhält ein ihr zugeordnetes Präfix, z.B. „hsa“ beim Menschen. Außerdem werden reife miRNA mit „miR“ gekennzeichnet, wohingegen bei miRNA-Genfamilien und -Vorstufen das „mir“ klein geschrieben wird. Zusätzlich erhält jede miRNA in der Nomenklatur eine Zahl, die auf der durchgehenden Nummerierung der miRNA in der Reihenfolge ihrer Entdeckung beruht. Paraloge Sequenzen mit nur ein bis zwei Basen Unterschied erhalten bei gleicher Nomenklatur Buchstaben-Suffixe wie a und b. Die miRNA-Sequenzen, welche von unterschiedlichen Genorten abstammen, jedoch identische Gegenstränge

besitzen, erhalten Zahlen-Suffixe wie „1“ und „2“. Da es möglich ist, dass aus einem miRNA-miRNA* Duplex zwei funktionelle miRNA hervorgehen, werden die reifen miRNA nach dem Arm benannt, aus dem sie entstehen und erhalten dann das Suffix 5p oder 3p. Exemplarisch lassen sich aus der Nomenklatur von hsa-miR-125b-1-3p folgende Informationen entnehmen: Es handelt sich um eine reife menschliche miRNA, die aus dem 3p-Arm des Duplex hervorgeht, wobei mindestens eine paraloge Sequenz mit dem Präfix a und außerdem mindestens eine miRNA eines anderen Genortes mit identischen Gegenstrang, existiert. Da es durch die Neuentdeckung von miRNA regelmäßig zu Änderungen in der Nomenklatur zwischen verschiedenen miRBase-Versionen kommt, erhalten alle miRNA zusätzlich eine dauerhafte Zugangsnummer, so dass sie bei Änderung des Namens wiedergefunden werden können. Insgesamt stehen bei miRBase die Übersicht, Sammlung und Archivierung allgemeiner Informationen zu den einzelnen miRNA und weniger deren Interaktionen im Vordergrund [99, 134].

Eine andere Gruppe von Datenbanken befasst sich mit dem Zusammenfassen und Ordnen von experimentell nachgewiesenen miRNA-mRNA-Interaktionen, indem auf Literaturbasis neueste Studienergebnisse zusammengetragen werden und regelmäßig in die Datenbanken integriert werden. So können diese Datenbanken einen guten Überblick über den aktuellen Stand der miRNA-Zielgen-Forschung bieten. Zu dieser Form von Datenbanken gehören z.B. TarBase [135] und miRTarBase [136]. Dabei ist miRTarBase auf einem aktuelleren Stand als TarBase, weswegen sie eine größere Anzahl an miRNA-mRNA-Interaktionen aufweist [136].

Insgesamt gibt es bisher nur relativ wenig experimentell nachgewiesene miRNA-mRNA-Interaktionen, da es sehr aufwendig und teuer ist mögliche Ziel-mRNA einer miRNA experimentell zu bestimmen [137]. Das liegt u.a. daran, dass eine einzelne miRNA in der Lage ist, die Expression mehrerer Hundert verschiedener mRNA zu beeinflussen [107]. Aus diesem Grund werden oft bioinformatische Algorithmen angewandt, um potentielle Ziel-mRNA vorherzusagen. Dabei werden häufig Parameter, die auf dem miRNA-Funktionsverständnis beruhen (z.B. perfekte Basenpaarung in der *Seed*-Region, evolutionäre Konservierung der Bindestellen in verschiedenen Spezies und thermodynamische Stabilität der miRNA-mRNA-Interaktion) in die Berechnungen der potentiellen Ziel-mRNA mit einbezogen [137]. Der Nachteil dieser Methode ist die oft große Anzahl an potentiellen Interaktionen und die damit einhergehenden vielen falsch-positiv vorhergesagten Ziel-mRNA. Häufig werden mehrere tausend Ziel-mRNA für eine miRNA vorhergesagt. Da inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Vorhersage-Algorithmen mit teils verschiedenen Ansätzen und Parametern entwickelt wurden, können die vorhergesagten Ergebnisse zwischen diesen Algorithmen stark abweichen. Dies kann die Auswertung und Beurteilung der vorhergesagten Ergebnisse erschweren [137, 138].

Zu den weltweit am häufigsten genutzten Datenbanken, die Vorhersagealgorithmen für miRNA-mRNA-Interaktionen verwenden, gehören u.a. TargetScan [139], DIANA-microT [140], PicTar [141], MicroCosm [142] und microRNA.org [143]. Dabei beruhen die Datenbanken von MicroCosm und microRNA.org beide auf dem Algorithmus „miRanda“ [142, 143]. Außerdem gibt es Datenbanken, die die Ergebnisse von anderen Datenbanken sammeln und den Zugang sowohl zu experimentell validierten miRNA-mRNA-Interaktionen als auch zu bioinformatisch berechneten Interaktionen anbieten. Dazu gehören z.B. die miRecords [144] und die miRWalk Datenbank [145]. miRWalk bietet nicht nur die Möglichkeit, Interaktionen über den miRWalk-Algorithmus zu berechnen, sondern auch gleichzeitig die Option, diese Ergebnisse mit den Ergebnissen von bis zu 9 anderen Vorhersage-Algorithmen zu vergleichen. Wählt man die Einstellung, dass eine potentielle Ziel-mRNA von einer bestimmten Mindestanzahl dieser Algorithmen übereinstimmend vorhergesagt sein muss, kann man die hohe Anzahl an Resultaten und womöglich falsch-positiven Ergebnissen reduzieren.

Ein weiterer Ansatz bei den bisher entwickelten Datenbanken findet sich in der Betrachtung der Verbindung zwischen miRNA und verschiedenen Krankheiten. Diesen Schwerpunkt setzen z.B. die Datenbanken miR2Disease [128] und PhenomiR [146]. Hierbei recherchieren die Betreiber in der Literatur, um Assoziationen von miRNA zu Krankheiten zu sammeln und diese Informationen in übersichtlicher Form zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise kann zum einen gesehen werden, ob eine Krankheit mit Veränderungen bei der miRNA-Expression einhergeht und zum anderen, ob eine bestimmte miRNA wiederholt bei verschiedenen Krankheiten beschrieben wird. Insbesondere miR2Disease gibt zusätzlich einen Einblick darüber, ob die Expression einer miRNA als unter einer Krankheit erhöht oder erniedrigt beschrieben worden ist. Diese Informationen beruhen auf experimentellen Studien und nicht auf bioinformatischen Berechnungen.

Andere Datenbanken bieten Expressionsprofile von miRNA an. Insbesondere wurden zell- und gewebsspezifische miRNA-Level gemessen, um Expressionsmuster von miRNA aufzudecken. MiRDB [147, 148] verwendet dabei z.B. die Expressionsdaten zu 40 menschlichen Geweben von Liang *et al.* [149]. Dahingegen bietet MirZ [150] den Expressionsatlas smirnaDB, welcher auf den Daten von Landgraf *et al.* [118] basiert und nicht nur die Expressionslevel von gesunden, sondern auch von malignen Zellen und Geweben enthält. Neben smirnaDB nutzt auch miRGen 2.0 [151] die Daten von Landgraf *et al.* [118], bietet daneben aber auch die Möglichkeit, sich sowohl SNPs in der pre-miRNA-Lokalisation als auch vorhergesagte TF-Bindungsstellen (TFBS) in der Promotorregion von pri-miRNA anzeigen zu lassen. Neben all den genannten Datenbanken existiert eine Vielzahl weiterer Datenbanken [152-157], auf die der Übersicht halber nicht im Detail eingegangen wird, wovon ein Teil aber exemplarisch in Tab. 3 gelistet ist.

2. Ziel- und Fragestellungen

2.1. Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

In dem relativ jungen Feld der miRNA-Forschung kam es innerhalb der letzten Jahre zur Etablierung einer Vielzahl öffentlich-zugänglicher miRNA-Datenbanken. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrem Aufbau und ihrer Aktualität, sondern auch in ihren allgemeinen Inhalten. Insgesamt ist es für Einsteiger sehr schwer, sich einen guten Überblick über die vielen miRNA-Datenbanken und deren enthaltene Informationen zu verschaffen. Die integrative Analyse der Informationen aus verschiedenen Datenbanken ist zentraler Bestandteil dieser Arbeit, d.h. dass Daten aus verschiedenen Datenbanken unter Berücksichtigung von Informationen aus anderen Datenbanken extrahiert und validiert werden. Es sollten exemplarisch Informationen zu miRNA im Kontext der Krankheit MS gesammelt werden. Dabei sollten folgende Zielstellungen verfolgt werden:

- Entwicklung eines allgemeinen Arbeitsschemas zur Nutzung von Informationen aus unterschiedlichen miRNA-Datenbanken
- Vermittlung eines Überblicks zu Unterschieden sowie Anwendungsbereichen von ausgewählten miRNA-Datenbanken
- Gewinnung allgemeiner Informationen zu MS-assoziierten miRNA
- Erkenntnisgewinn hinsichtlich des Einflusses und der molekularen Funktion von miRNA in der Pathophysiologie der MS
- Evaluation von miRNA als potentielle Biomarker bei MS

Für die geplanten Analysen ergaben sich dabei folgende Fragestellungen:

- Welche Arten von miRNA-Datenbanken existieren im Allgemeinen?
- Welche miRNA wurden in der Vergangenheit in der Literatur mit MS assoziiert und sind in, auf Krankheits-assoziierte miRNA spezialisierte, Datenbanken gelistet?
- Welche potentiellen Zielgene werden durch miRNA posttranskriptionell reguliert? Spielen diese Zielgene eine Rolle in der Pathophysiologie der MS?
- Welche molekulare Funktion nehmen potentielle Zielgene und damit indirekt die miRNA in Zellen und Signalwegen ein? Bestehen dabei Assoziationen zu MS?
- Welche TF regulieren die MS-assoziierten miRNA? Sind darunter MS-assoziierte TF?

- Existieren Rückkopplungsschleifen zwischen den MS-assoziierten miRNA, den Zielgenen und den miRNA-regulierenden TF ?
- Wie ist das Expressionsprofil von MS-assoziierten miRNA in verschiedenen Subtypen von Blut- und Hirnzellen?
- Welche microRNA wurden bereits wiederholt von verschiedenen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit MS beschrieben?

Im Vordergrund dieser Arbeit steht somit, dass Möglichkeiten aufgezeigt werden allgemeine Informationen zu MS-assoziierten miRNA zu gewinnen, potentielle Zielgene dieser miRNA aufzudecken sowie deren Expressionsprofil in verschiedenen Zelltypen und Geweben darzustellen. Zusätzlich sollen die Funktionen der potentiellen miRNA-Zielgene in Zellen analysiert werden, um der MS zu Grunde liegende Prozesse und immunologische Vorgänge besser verstehen zu können.

2.2. Analyse der Expression von microRNA und mRNA im Blut von Multiple Sklerose Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie

Es existieren bisher kaum Studien, die sich mit dem Einfluss von immunmodulatorischen Therapien auf das miRNA-Expressionsprofil in Blutzellen von MS-Patienten beschäftigen. Dabei handelt es sich um ein wichtiges Forschungsgebiet, welches helfen könnte, Wirkmechanismen von Therapien besser zu verstehen und neue therapeutische Biomarker zu entdecken. Dies ist die erste longitudinale Studie, die *in vivo* parallel sowohl miRNA- als auch mRNA-Expressionsänderungen bei MS-Patienten unter IFN-beta-Therapie untersucht hat.

Dabei wurden folgende Zielstellungen verfolgt:

- Bewertung des Einflusses der IFN-beta-1b-Therapie auf die miRNA- und mRNA-Expression in PBMC von MS-Patienten
- Aufdecken neuer molekularer Regulationsmechanismen der IFN-beta-1b-Therapie
- Erkenntnisgewinn zum Wirkmechanismus der IFN-beta-Therapie auf molekularer Ebene
- Evaluation des Potentials der verändert exprimierten miRNA als Biomarker für die biologische Wirkung der IFN-beta-1b-Therapie

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Wie verändern sich miRNA- und mRNA-Expressionslevel parallel im Blut von bisher immunmodulatorisch unbehandelten Patienten unter einer IFN-beta-1b-Therapie ?
- Wie viele und welche miRNA bzw. mRNA zeigen Expressionsänderungen unter einer Interferon-beta-1b-Therapie ?
- Existieren Unterschiede in den miRNA- und mRNA Expressionsänderungen im Zeitverlauf ?
- Werden die differentiell exprimierten mRNA bekanntermaßen von IFN-beta in der Expression beeinflusst?
- Welche miRNA zeigen vor Therapiebeginn die höchsten Expressionslevel? Sind diese bereits in Verbindung mit MS diskutiert worden?
- Existieren potentielle Interaktionen zwischen den unter der IFN-beta-1b-Therapie differentiell exprimierten miRNA zu den differentiell exprimierten mRNA?
- Werden bisher beschriebene potentiell bei MS-Patienten dysregulierte miRNA durch die IFN-beta-Therapie in ihrer Expression beeinflusst?
- Könnten sich miRNA als therapeutische Biomarker für die biologische Wirkung der IFN-beta-1b-Therapie eignen?

3. Material und Methoden

3.1. Integrative Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

3.1.1. Verwendete microRNA Datenbanken im Detail

Für die integrative Analyse von MS-assoziierten miRNA wurden ausgewählte, öffentlich zugängliche miRNA-Datenbanken verwendet (Abb. 3). Zunächst wurde sich ein Überblick über existierende Datenbanken verschafft (Kapitel 1.1.4), um entscheiden zu können, welche für die bevorstehende Analyse geeignet sind. Für die Analyse der allgemeinen Charakteristika sollte vor allem die Aktualisierung in regelmäßigen Abständen sowie das Ansehen der Datenbank in der wissenschaftlichen Gemeinschaft eine wichtige Rolle spielen. Es wurde sich hierbei für den Goldstandard, die Sammelstelle für allgemeine Informationen und Nomenklaturen von miRNA entschieden. Bei den existierenden Datenbanken zu den Literatur-basierten Zielgenen wurde die Datenbank, welche zu dem damaligen Zeitpunkt die meisten gesammelten miRNA-Zielgen-Interaktionen und die regelmäßigsten Aktualisierungen aufwies, gewählt. Für die Auswahl des bioinformatischen miRNA-Zielgen-Algorithmus wurde festgelegt, dass dieser nicht nur eigene Ergebnisse, sondern auch die von anderen etablierten Algorithmen berücksichtigen muss, um die erwartete hohe Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen zu reduzieren. Die Datenbank für miRNA-Expressionsprofile sollte die Voraussetzung erfüllen, dass Daten zur Expression von miRNA in verschiedenen Subtypen der Immun- und Hirnzellen, welche bekanntlich eine Rolle bei MS einnehmen, vorhanden sind. Bei den Krankheiten-assoziierten Datenbanken sollte die verwendet werden, welche bis zum damaligen Zeitpunkt die meisten Informationen zu MS-assoziierten miRNA gesammelt hatte. Bei der Auswahl der Datenbank, aus welcher Informationen zu den die miRNA-regulierenden TF entnommen werden sollten, wurde der Fokus darauf gelegt, dass die Vorhersagen der TFBS auf Basis der Genlokalisierung der *primary*- und nicht der *precursor*-miRNA getroffen wurden.

Aus der Datenbank miR2Disease [128] konnten miRNA, welche bisher in der Literatur auf Basis experimenteller Daten mit MS in Verbindung gebracht wurden, entnommen werden und mit Hilfe weiterer Datenbanken (miRBase [134], miRWalk [145], miRTarBase [136], miRGen 2.0 [151] und smirnaDB [150]) einer detaillierten Analyse unterzogen werden. Allgemeine Informationen über die MS-assoziierten miRNA wurden der Datenbank miRBase [134] entnommen. Für die Ermittlung von möglichen miRNA-mRNA-Beziehungen wurden die miRTarBase-Datenbank [136] und die miRWalk-Datenbank [145] genutzt. Um Aufschluss über TF, die potentiell die Expression der MS-assoziierten miRNA regulieren, zu erhalten, wurden Vorhersagen aus der miRGen 2.0 Datenbank [151] verwendet. Für die vergleichende Analyse der miRNA-

Expressionsprofile in Zellen und Geweben wurden Expressionsdaten der MS-assoziierten miRNA aus der smirnaDB Datenbank [150] entnommen und visualisiert. Ein Flussschema des Studiendesigns zur integrativen Analyse der MS-assoziierten miRNA wird in Abb. 3 veranschaulicht.

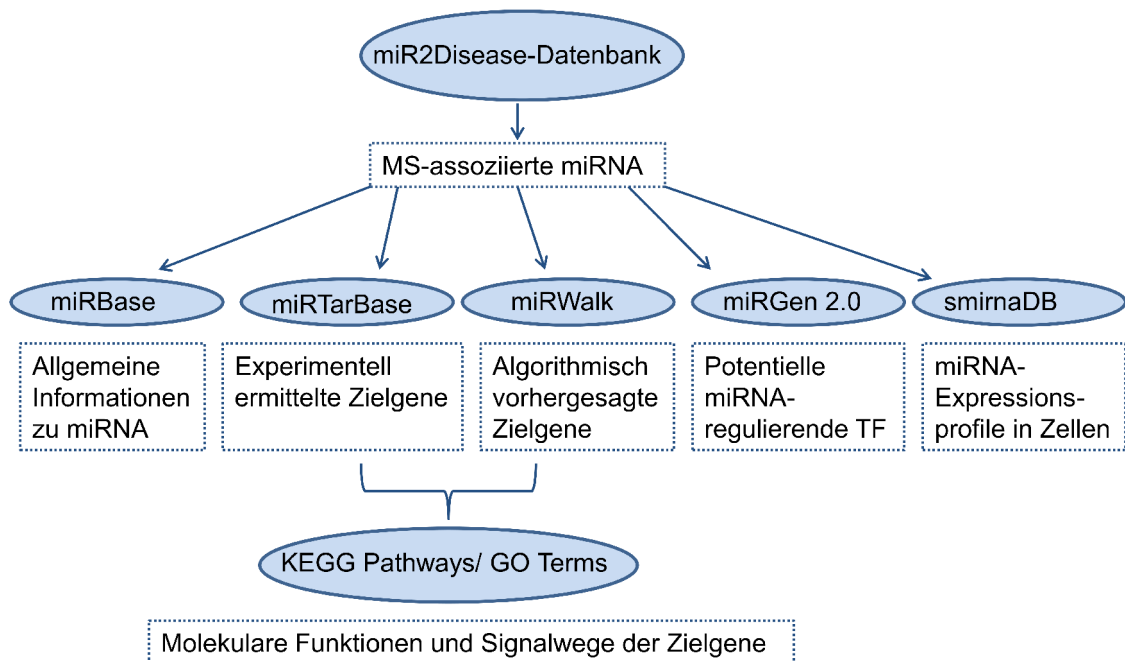


Abb. 3: Flussschema des Studiendesigns zur integrativen Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA. Der miR2Disease-Datenbank wurden in der Literatur mit MS assoziierte miRNA entnommen. Diese wurden mittels weiterer miRNA-Datenbanken (miRBase [134], miRWalk [145], miRTarBase [136], miRGen 2.0 [151] und smirnaDB [150]) integrativ analysiert.

TF= Transkriptionsfaktor; miRNA= microRNA.

3.1.1.1. Assoziationen von microRNA zu Krankheiten

Bei der miR2Disease Datenbank [128] handelt es sich um eine übersichtliche Quelle, welche miRNA auflistet, die experimentell bei bestimmten Krankheitsbildern als dysreguliert nachgewiesen wurden. Die letzte überarbeitete Version aus dem März 2011 enthält insgesamt 3273 Einträge zu 163 verschiedenen Krankheiten und 349 miRNA. Diese Informationen zu möglichen Verbindungen zwischen miRNA und Erkrankungen wurden durch manuelle Literaturrecherche gesammelt und anschließend zu Datenbankeinträgen verarbeitet. Diese Einträge geben Auskunft über die Studienergebnisse, die verwendeten Untersuchungsmethoden, die Beziehung einer miRNA zur Erkrankung (z.B. Kausalität) und die Art der Veränderung der miRNA-Expression im Krankheitszustand. Zusätzlich gibt es Verweise zur Primärliteratur, zu anderen Datenbanken sowie zu experimentell validierten Zielgenen, welche aus TarBase [135] und Publikationen entnommen wurden. miR2Disease bietet bei den Suchoptionen die

Möglichkeit, neben dem miRNA-Namen auch direkt nach Krankheiten oder experimentell nachgewiesenen Zielgenen zu suchen [128]. Insgesamt ließen sich verschiedene MS-assoziierte miRNA aus 4 verschiedenen Studien (Keller *et al.* 2009 [129], Otaegui *et al.* 2009 [130], Du *et al.* 2009 [131] und Cox *et al.* 2010 [132]), welche im Kapitel 4.1.1 näher erläutert werden, aus der miR2Disease Datenbank entnehmen. Sie wurden anschließend mit Hilfe der Informationen aus den Datenbanken miRBase [134], miRWalk [145], miRTarBase [136], miRGen 2.0 [151] und smirnaDB [150] analysiert.

3.1.1.2. Allgemeine Informationen zu microRNA

miRBase [134] ist die zentrale Datenbank für allgemeine Informationen und die Nomenklatur aller bisher bekannten miRNA. Die Version 18 von miRBase (Stand April 2013) enthält insgesamt 18226 Vorläuferformen und 21643 reife miRNA von 168 verschiedenen Spezies. Davon sind 1527 Vorläuferformen und 1921 reife miRNA-Sequenzen dem Menschen zugeordnet. miRBase bietet eine Auflistung aller aktuellen miRNA-Einträge, eine Sequenzsuche, Links zur Primärliteratur und zu anderen Datenbanken sowie detaillierte Informationen über die miRNA z.B. Sequenzen und Genloci, Lokalisation in proteinkodierenden Genen, homologe Sequenzen, Cluster- und Familienzugehörigkeiten [134]. Die MS-assoziierten miRNA, welche miR2Disease entnommen wurden, wurden mit Hilfe von miRBase auf die Lage ihrer Transkript-Vorstufen im Genom untersucht. Insbesondere wurden hierbei die intra- oder intergenische Lage sowie die Zugehörigkeit der miRNA zu Clustern ermittelt.

3.1.1.3. Experimentell ermittelte microRNA-Zielgene

In der vorliegenden Arbeit wurden die MS-assoziierten miRNA mit Hilfe von miRTarBase [136] auf experimentell ermittelte Interaktionen mit mRNA untersucht. Diese Datenbank enthält in der Version 2.4 vom Oktober 2011 insgesamt 4270 miRNA-mRNA-Interaktionen von 669 miRNA und 2553 Zielgenen. Davon sind 3051 Interaktionen zwischen 287 miRNA und 1798 Zielgenen für den Menschen aufgelistet. Für die Zusammenstellung der Datenbank wurden Veröffentlichungen über miRNA-Zielgen-Interaktionen Literatur-basiert detektiert und anschließend durch Wissenschaftler begutachtet. Im Allgemeinen sind die Interaktionen durch Mikroarray-, Western Blot- oder Reporter Assay-Experimente ermittelt worden. Die Art des Experiments sowie die Art der posttranskriptionalen Regulation (Herab- vs. Hoch-Regulation) eines Zielgens durch eine miRNA sind in der Datenbank gespeichert [136].

3.1.1.4. Bioinformatische Vorhersage-Algorithmen zur Berechnung von microRNA-Zielgenen

Bisher gibt es, im Vergleich zur vermuteten Anzahl von Interaktionen, nur relativ wenig experimentell nachgewiesene miRNA-mRNA-Interaktionen. Potentiellen Zielgene werden daher in der Regel mit Hilfe von bioinformatisch entwickelten Algorithmen errechnet. Oftmals wird eine Kombination der Methoden angewandt, um Zielgene zu bestimmen, d.h. zuerst werden potentielle Zielgene mit Algorithmen vorhergesagt und anschließend experimentell überprüft [138]. Die Berechnungen der Algorithmen erfolgen auf der Grundlage von experimentell beobachteten Einflussfaktoren bei der Zielgenerkennung von miRNA. Dazu zählen z.B. der Einfluss der perfekten Basenpaarung zwischen der *Seed*-Region der miRNA und der Bindestelle der mRNA, die Lage, der Kontext und die Zugänglichkeit der Bindestelle, evolutionäre Sequenzkonservierung sowie die thermodynamische Bindungsstabilität zwischen den beiden RNA-Molekülen [138]. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde für die algorithmisch ermittelten Interaktionsergebnisse die miRWalk Datenbank verwendet, da diese Datenbank neben einem eigenen Vorhersage-Algorithmus die Möglichkeit bietet, vorhergesagte Interaktionen mit weiteren etablierten Algorithmen direkt zu vergleichen. Da in dieser Arbeit diese Möglichkeit genutzt wurde, werden diese Algorithmen nachfolgend im einzelnen kurz vorgestellt.

miRWalk

miRWalk [145] ist eine Datenbank, welche einen eigenen Algorithmus zur Berechnung potentieller Zielgene anbietet. Dieser berücksichtigt neue Erkenntnisse, nach welchen miRNA nicht nur in der 3'UTR sondern auch in der 5'UTR, in kodierenden Bereichen und sogar in der Promotorregion binden können [158, 159]. Bei der Suche nach potentiellen miRNA-Bindestellen untersucht der Algorithmus die 7nt lange und bei Position Eins oder Zwei des 5' Endes beginnende *Seed*-Region der miRNA auf Komplementarität zu Gensequenzen. Bei perfekter Watson-Crick-Basenpaarung wird die Suche auf die benachbarten Bereiche außerhalb der *Seed*-Region ausgeweitet bis ein „*Mismatch*“ auftritt. Es folgt die Ordnung nach Länge der miRNA-Bindestellen, da angenommen wird, dass lange perfekte Paarungen mit einer größeren Chance für eine effektive Interaktion einhergehen. Für die Resultate, die in der 3'UTR lokalisiert sind, besteht die Möglichkeit, die Ergebnisse mit 9 etablierten Algorithmen abzugleichen. Dies sind PicTar4 und PicTar5 (Version von 2007), PITA (Version von 2008), miRanda (Version von 2010), DIANA-microT (Version 3.0), TargetScan (Version 5.1), RNAhybrid (Version 2.1), RNA22 (Version von 2008) und miRDB (Version von 2009). Im Ergebnis werden alle Interaktionen in der Reihenfolge des Grades der höchsten Übereinstimmung zwischen allen ausgewählten Algorithmen ausgegeben. Dabei kann benutzerdefiniert vorgegeben werden, wieviele und welche Algorithmen berücksichtigt werden sollen [145]. In dieser Arbeit wurde für die

Zielgenvorhersage mit miRWalk die vorhandene Option des Webserver, Berechnungen mit allen 10 angebotenen Vorhersage-Algorithmen durchzuführen und die Ergebnisse direkt zu vergleichen, genutzt. Um die enorm hohe Zahl an Ergebnissen zu reduzieren, wurde festgelegt, dass eine miRNA-mRNA-Interaktion von mindestens 7 der 10 Algorithmen übereinstimmend vorhergesagt sein muss, um in den Ergebnissen zu MS-assoziierten miRNA berücksichtigt zu werden.

miRanda

Die Version von miRanda [142, 143], die bei miRWalk angeboten wird, stammt vom August 2010. Hierbei handelt es sich um einen gewichteten dynamisch programmierten Algorithmus, der nach komplementären, potentiellen Bindestellen für miRNA in 3'UTR Sequenzen sucht. Für die Berechnung der Interaktionen wird eine Scoring-Matrix herangezogen, in welche perfekte und nicht-perfekte Basenpaarungen zwischen *Seed*-Region und mRNA eingehen. Die Paarungen der ersten 10 nt am 5'Ende der miRNA werden besonders hoch gewichtet und schwache Bindungen am 5'Ende können durch stabile Bindungen am 3'Ende ausgeglichen werden. Anschließend wird mit dem Vienna RNA Package [160] die Hybridisierungsenergie zwischen den Interaktionspartnern berechnet und die Sequenzkonservierung der Bindestellen zwischen verschiedenen Spezies überprüft. Zusätzlich geht auch die Anzahl der Bindestellen innerhalb einer 3'UTR in die Wertung mit ein, da die gleiche miRNA an mehreren Stellen einer 3'UTR binden kann [142, 143].

TargetScan

Von TargetScan [139] wird die Version 5.1 von miRWalk verwendet. Auch dieser Algorithmus sucht nach konservierten Bindestellen in der 3'UTR Sequenz, wobei die *Seed*-Region vom 2.-8. nt der miRNA eine perfekte Basenpaarung aufweisen muss. Die Gesamtbewertung der Bindestellen erfolgt nach dem Grad der evolutionären Konservierung, ihrem Kontext und der Lage sowie der Bindestellenanzahl in einer 3'UTR. Anschließend müssen die potentiellen miRNA-mRNA-Interaktionen noch die thermodynamische Prüfung mit dem Vienna RNA Package [160] bestehen, um als potentielle Ziele in Frage zu kommen [139].

DIANA microT v3.0

DIANA microT v3.0 [140] ist ein dynamisch programmierter Algorithmus, der nach möglichen komplementären Watson-Crick-Paarungen zwischen einer miRNA-Sequenz und 3'UTRs sucht. Dabei wird eine mindestens 7 nt lange Paarung, beginnend von der ersten oder zweiten Position des 5'Endes der miRNA, verlangt. Nur 6 nt lange und damit schwächere Bindungssequenzen oder das energetisch nicht ideale Auftreten einer nicht-Watson-Crick-Paarung von Guanin (G) und Uracil (U) können akzeptiert werden, solange zusätzliche Bindungen am 3'Ende die Paarung stabilisieren. Anschließend folgt eine Bewertung der evolutionären Konservierung und der freien

Energie mit Hilfe von RNAhybrid [161], woraus ein gewichteter Gesamtscore aller potentiellen konservierten und nicht-konservierten Bindestellen in der 3'UTR gebildet wird [140].

RNAhybrid

Dieser Algorithmus ist von der klassischen RNA-Sekundärstruktur-Berechnung abgeleitet worden und bestimmt bevorzugt angestrebte Hybridisierungsstellen zwischen zwei RNA-Sequenzen. Nachdem in 3'UTR Regionen nach potentiellen Bindestellen gesucht wurde, wird die freie Energie des potentiellen Duplex und dazu ein p-Wert berechnet. Die Mindestlänge der *Seed*-Region sowie deren Position, die Akzeptanz für GU-Paarungen, die Mindestanzahl von Bindestellen in der 3'UTR und die minimale Bindungsenergie sind benutzerdefinierte Einstellungen, die individuell angepasst werden können [161]. Bei miRWalk sind diese Variablen durch die Verantwortlichen dieser Datenbank auf bestimmte Einstellungen festgelegt worden.

RNA22

RNA22 [162] ist ein Algorithmus, welcher die evolutionäre Sequenzkonservierung zwischen den Spezies nicht berücksichtigt. Zuerst wird nach möglichen Bindestellen für miRNA in 3'UTR Sequenzen der mRNA gesucht. Dabei werden insbesondere sogenannte „Zielinseln“ bestimmt, welche durch eine Mindestanzahl an komplementären, potentiellen Bindestellen in der 3'UTR Sequenz gekennzeichnet sind. In diesen Regionen ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine echte Bindestelle enthalten ist, besonders hoch. Anschließend werden mit dem Vienna RNA Package [160] die Hybridisierungsenergien berechnet [162].

PITA

Der PITA-Algorithmus [163] beruht auf der Beobachtung, dass die Zugänglichkeit der miRNA zu ihren Bindestellen durch die Sekundärstruktur der mRNA beeinflusst wird und es zu einer Beeinträchtigung der Repressionseffektivität kommen kann. Das bedeutet, dass eine stark ausgebildete Sekundärstruktur die Bindung einer miRNA verhindern kann. Auf dieser Grundlage wurde ein *Score* für miRNA-mRNA-Interaktionen entwickelt, mit dem komplementäre Bindestellen in den 3'UTRs bewertet werden. Neben der Zugänglichkeit der miRNA zu ihren Bindestellen, geht auch die Anzahl der Bindestellen in die Berechnung mit ein [163].

PicTar

Dieser thermodynamisch basierte Algorithmus sucht orthologe 3'UTR Sequenzen nach Stellen für eine komplementäre Basenpaarung mit der *Seed*-Region der miRNA ab. Bei PicTar wird die 7 nt lange *Seed*-Region als Nukleus bezeichnet und beginnt an erster oder zweiter Position des 5' Endes der miRNA. Es werden sowohl perfekte als auch nicht-perfekte Paarungen zugelassen. Anschließend wird die Sequenz-Konservierung zwischen den Spezies und die Hybridisierungsenergie mit RNAhybrid [161] überprüft. Dabei ist der Energiefilter für nicht-

perfekte Paarungen strenger als für perfekte Paarungen. Bindestellen, die diese Filter passiert haben, werden als Anker bezeichnet. 3'UTR mit einer ausreichend hohen Anzahl von Ankern kommen als Ziele in Betracht. Der erforderliche Grad der Sequenz-Konservierung kann in gewissen Maßen individuell festgelegt werden. PicTar5 stellt die Anforderung, dass Bindestellen nicht nur, wie bei PicTar4 in Mensch, Maus, Ratte und Hund, sondern auch im Huhn konserviert sein müssen. In der finalen Kalkulation der Interaktionen wird berücksichtigt, dass eine 3'UTR von verschiedenen miRNA gleichzeitig reguliert werden kann [141].

miRDB

miRDB [147, 148] verlangt eine perfekte *Seed*-Paarung zwischen dem 2.-8. nt oder 1.-7. nt des 5'Endes der miRNA. Dabei werden die evolutionäre Konservierung der Sequenzen, die Sekundärstruktur der mRNA, die Lokalisation der Bindestelle in der 3'UTR, aber nicht das Auftreten multipler Bindestellen berücksichtigt [147, 148].

3.1.1.5. Vorhersagen über die Regulation von microRNA durch Transkriptionsfaktoren

Für die integrative Analyse der MS-assoziierten miRNA wurde von miRGen 2.0 die Option genutzt, nach potentiell miRNA-regulierenden TF zu suchen. miRGen 2.0 [151] ist eine vielfältige Datenbank, die unterschiedliche Informationen zu miRNA anbietet. Unter anderem assoziiert sie miRNA mit potentiell sie regulierenden TF, indem mögliche DNA-Bindestellen für die Regulation der pri-miRNA-Transkription berechnet wurden. Die Transkriptionsstarts der miRNA-Transkripte im Genom wurden aus verschiedenen Publikationen bezogen [151]. Zur Bestimmung möglicher TFBS in den Promotorregionen wurden bei miRGen 2.0 die Regionen 5 Kilobasen vor bis eine Kilobase nach den miRNA-Transkriptionsstartpunkten mit Hilfe von MatchTM [164] auf potentielle Bindemöglichkeiten für DNA-bindende Domänen von TF untersucht. MatchTM ist eine Software, die basierend auf gewichteten Matrizen (*position weight matrices*, PWM) nach TFBS in DNA-Sequenzen suchen kann. Die Matrizen basieren auf der öffentlich zugänglichen Matrix-Bibliothek von TRANSFAC 6.0 [165], welche Daten zu TF und ihren Bindemotiven sammelt. Die Bindemotive eines TF oder einer Gruppe eng verwandter TF sind bei TRANSFAC als PWM in der Matrix-Bibliothek hinterlegt. Diese Bibliothek ist die Basis für Programme wie MatchTM, um Vorhersagen von potentiellen TF-Bindungsstellen in beliebigen DNA-Sequenzen zu treffen [165]. Zusätzlich bietet miRGen 2.0 miRNA-Expressionsprofile zu verschiedenen Zelllinien und Geweben, welche auf den Daten von Landgraf *et al.* [118] basieren. Eine weitere interessante Option ist es, sich SNP innerhalb der genomischen Region einer miRNA und der Bindestellen der sie regulierenden TF anzeigen zu lassen. Diese SNPs wurden dem UCSC *Genome Browser* [166] entnommen.

3.1.1.6. microRNA-Expressionsprofile von Zelltypen und Geweben

Der MirZ-Webserver der Universität Basel [150] bietet einen Atlas namens smirnaDB für miRNA-Expressionslevel in Zellen und Geweben an. Da höhere Konzentrationen einer miRNA stärkeren Einfluss auf die mRNA-Expression in einer Zelle oder in einem Gewebe nehmen [167, 168], ist es interessant, miRNA-Expressionsprofile in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben zu vergleichen. Der smirnaDB-Atlas [150] basiert auf von Landgraf *et al.* erhobenen Daten [118], welche die Expressionslevel von 692 menschlichen miRNA für 170 verschiedene Zelltypen und Gewebe enthalten. Dabei wurden sowohl gesunde und kranke Zellen als auch verschiedene Entwicklungsstadien der Zellen berücksichtigt. Deieser miRNA-Expressionsatlas basiert auf einer Sequenzanalyse von sogenannten Klonbibliotheken kleiner RNA. Dabei spiegelt die relative Klonhäufigkeit einer miRNA-Sequenz das Ausmaß der miRNA-Expression in den Zellen und Geweben wider [118].

In dieser Arbeit wurde die natürliche Expression von MS-assoziierten miRNA im Hirn und im Blut betrachtet, um herauszufinden, von welchen Zelltypen und in welchem Maß diese miRNA normalerweise exprimiert werden. Da bei MS eine Beteiligung unterschiedlicher Immunzellen, u.a. von TH1-, TH17-, Treg- und B-Zellen, die im Blut zirkulieren und die die Blut-Hirn-Schranke bei erhöhter Durchlässigkeit z.B. im akuten Schub überwinden, bekannt ist, wurde die Expression der MS-assoziierten miRNA in verschiedenen Blutzelltypen und in unterschiedlichen Hirnregionen verglichen. Dafür wurden die Daten aus der Datenbank smirnaDB [150] genutzt und mit Hilfe der Statistiksoftware R (www.r-project.org) in einer *Heatmap* visualisiert. *Heatmaps* sind zweidimensionale, grafische Präsentationen von Datenmatrizen. Die numerischen Werte werden hierbei durch ein Farbschema kodiert.

3.1.2. Multiple Sklerose-assoziierte microRNA und ihre Interaktionen mit Zielgenen und Transkriptionsfaktoren

3.1.2.1. Analyse der Interaktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Um das genregulatorische Netzwerk der MS-assoziierten miRNA besser verstehen zu können, wurde eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Diese Analyse diente als Grundlage für weitere Untersuchungen, wobei potentielle miRNA-Zielgene identifiziert, deren Funktionen untersucht und somit eine indirekte Funktionsanalyse der miRNA durchgeführt wurden. Hierfür wurden den Datenbanken miRWalk und miRTarBase (August 2011) die enthaltenen miRNA-mRNA-Interaktionen entnommen. Anschließend wurden diese Interaktionen in Form eines Netzwerkes mit Hilfe der Software Cytoscape (Version 2.8.1) [169] visualisiert und ausgewertet. Mit dieser frei zugänglichen Software können biologische Netzwerke sowohl veranschaulicht als auch

analysiert werden. Das zentrale Prinzip besteht darin, dass Interaktionspartner in einer Graphik als Knoten visualisiert werden und über Kanten, die die Interaktionen darstellen, verbunden sind. Attribute wie Farben, Formen, Muster und Größe von Kanten und Knoten können individuell angepasst werden. Für die Anordnung des Netzwerkes kann man zwischen verschiedenen Layout-Algorithmen auswählen (z.B. „*spring-embedded*“, „*hierarchical*“ oder „*circular*“). In dieser Arbeit wurde der sehr gängige „*spring-embedded*“ Algorithmus gewählt, der den Vorteil bietet, dass Knoten mit vielen identischen Interaktionspartnern näher beieinander liegend dargestellt werden als Knoten mit wenigen gemeinsamen Interaktionspartnern. Inzwischen wurden viele sogenannte *Plugins* für Cytoscape entwickelt, um zusätzliche Algorithmen, Netzwerkanalysen und weitere Funktionen in das Programm integrieren zu können.

Neben der Analyse von möglichen Zielgenen der MS-assoziierten miRNA wurde außerdem untersucht, welche TF möglicherweise an die Promotorregionen der entsprechenden pri-miRNA binden und somit die Expression der MS-assoziierten miRNA regulieren. Die vorhergesagten TFBS wurden miRGen 2.0 entnommen und dabei solche, welche nicht zu Mensch, Maus oder Ratte gehören, außer Acht gelassen. Des Weiteren wurden mit Hilfe der Software STAMP [170] PWM, die von TRANSFAC mit TF assoziiert wurden, in Gruppen zusammengefasst, um Redundanzen in TRANSFAC zu reduzieren. Diese Redundanzen in TRANSFAC kommen u.a. durch gleichzeitig vorliegende alte und neue Versionen von PWM für dieselben TF zustande. STAMP ist eine Software, die es ermöglicht, DNA-Bindemotive durch multiples *Alignment* auf evolutionäre Verwandtschaft hin zu untersuchen und Stammbäume zu erstellen. Strukturell ähnliche oder verwandte TF mit ähnlichen Bindungspräferenzen können auf diese Weise zusammengefasst werden. Durch Verwendung dieser Software wurde die Anzahl der TF-Knoten, die für potentiell miRNA-regulierende TF stehen, kondensiert, bevor diese in das Cytoscape Netzwerk integriert wurden. Alle Informationen zu miRNA-mRNA- und TF-miRNA-Interaktionen wurden in das Cytoscape Programm (Version 2.8.1) geladen und als Netzwerk visualisiert. Die Knoten veranschaulichen die Interaktionspartner miRNA, TF und Zielgen, wohingegen die sie verbindenden Kanten die Interaktionen darstellen.

Anschließend wurde untersucht, welche miRNA besonders große Übereinstimmungen in ihren Zielgenen aufweisen und somit ähnliche Funktionen erfüllen könnten. Außerdem wurden die Zielgene näher betrachtet, welche die meisten Interaktionen mit den MS-assoziierten miRNA aufweisen. Solche Gene mit besonders hohem "Knotengrad" im Netzwerk werden auch als "miRNA-Target-hubs" bezeichnet [171]. Diese wurden mittels Literaturrecherche auf Assoziationen zu MS und dem Immunsystem hin überprüft. Dazu wurde in PubMed mit Hilfe von den Schlagwörtern „*multiple sclerosis*“, „*immune system*“, „*T cell*“, „*B cell*“, „*EAE*“ und „*autoimmune disease*“ in Verbindung mit dem jeweiligen Zielgen nach entsprechenden Literatur-basierten Ergebnissen gesucht.

3.1.2.2. Funktionsanalyse der Zielgene von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Zur Untersuchung der potentiellen Funktionen und Einflüsse von miRNA wurde eine sogenannte „*Gene Set Enrichment*“-Analyse der potentiellen miRNA-Zielgene durchführt [172]. Dabei wird getestet, ob die Gene eines bestimmten Signalweges oder einer bestimmten funktionellen Gruppe in einer Liste von Genen überrepräsentiert, also „angereichert“ (englisch: „*enriched*“) sind [173]. Auf diese Weise lässt sich indirekt über die Hauptfunktion der Zielgene auf mögliche zelluläre Funktionen und Einflüsse der MS-assoziierten miRNA schließen.

Die Analyse wurde mit Hilfe der zwei Datenbanken KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [174] und *Gene Ontology* (GO) [175], die Gene in funktionelle Gruppen einteilen und somit die Zuordnung von Genen zu bestimmten Signalwegen, molekularen Funktionen und biologischen Prozessen ermöglichen, durchgeführt. Für die *Enrichment*-Analyse wurden die funktionellen Gruppenzugehörigkeiten der Zielgene mit denen einer Referenzgenliste, die aus sämtlichen Geneinträgen der GeneCards Datenbank (Version 3.04) (www.genecards.org) bestand, verglichen [176]. Es wurde das R-Paket GStats [177] verwendet, welches die Möglichkeit einer funktionellen Analyse von beliebigen Genlisten nach Verbindungen zu GO Kategorien (englisch: *GO terms*) und KEGG-Signalwegen bietet. Dabei können überrepräsentierte GO und KEGG Kategorien bezüglich der Genliste aufgedeckt werden. Die Assoziationen der funktionellen Gengruppen zur Zielgenliste mit denen zur Referenzgenliste wurden verglichen, um signifikant überrepräsentierte Gruppen bei den Zielgenen zu identifizieren.

Die Ergebnisse aus den KEGG- und GO-Analysen wurden in einer Tabelle vereint, wobei alle Genfunktionsgruppen mit einer Odds Ratio größer als Zwei herausgefiltert und nach p-Werten sortiert wurden. Die Odds Ratio ist ein statistisches Maß für die Stärke eines Zusammenhangs zweier Merkmale und ein Quotenverhältnis zweier Odds (Wahrscheinlichkeiten). Die Odds Ratio nimmt als Quotient von Wahrscheinlichkeiten immer Werte größer oder gleich Null an, wobei Werte nahe Eins signalisieren, dass vermutlich kein Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen besteht [178]. Die ersten 15 Hauptfunktionen und Signalwege wurden auf ihre Bedeutung bezüglich MS interpretiert, indem auch hier eine Literaturrecherche zu den Stichworten „*multiple sclerosis*“, „*immune system*“, „*T cell*“, „*B cell*“, „*EAE*“ und „*autoimmune disease*“ durchgeführt wurde.

3.2. Expression von microRNA und mRNA im Blut von Multiple Sklerose Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie

3.2.1. Patientenkohorte

Für die Untersuchung, ob eine IFN-beta-1b-Therapie bei MS-Patienten Einfluss auf die Expression von miRNA in Blutzellen hat, konnten im Zeitraum von Juni bis August 2010 insgesamt 6 Patienten (MS01-MS06) an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock rekrutiert werden (Tab. 4), wobei die erhobenen Daten anonymisiert verarbeitet wurden.

Tab. 4: Allgemeine Informationen zu den untersuchten Patienten

Patienten	Geschlecht	Alter	Verlaufsform	Krankheitsdauer (Monate)	EDSS (Therapiebeginn)
MS01	weiblich	28	KIS	1	1,0
MS02	weiblich	38	RRMS	2	1,5
MS03	weiblich	22	RRMS	1	1,5
MS04	weiblich	50	RRMS	12	2,5
MS05	weiblich	60	KIS	2	1,5
MS06	weiblich	27	RRMS	2	2,0

Die 6 Patienten (MS01-MS06), deren microRNA- und mRNA-Expression in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) im Verlauf der IFN-beta-1b-Therapie analysiert wurde, sind alle weiblichen Geschlechts. Das Alter der Patienten lag bei Studienbeginn zwischen dem 22. und 60. Lebensjahr. Der EDSS lag zwischen 1,0 und 2,5.

EDSS= *Expanded Disability Status Scale*, KIS= klinisch isoliertes Syndrom, RRMS= schubförmig-remittierende Multiple Sklerose.

Die 6 Patienten waren alle weiblich, kaukasischer Abstammung und hatten bis zum Therapiebeginn noch keinerlei immunmodulierende Therapien oder Plasmapheresen erhalten. Von den 6 Patienten zeigten zu Studienbeginn 4 einen schubförmigen Verlauf der MS (RRMS). MS01 und MS05 wiesen ein klinisch isoliertes Syndrom (KIS) vor. Die Diagnose wurde anhand der revidierten McDonald-Kriterien von 2010 [62] (Vergleich Kapitel 1.1.4.1) gestellt. Alle Patienten befanden sich in einer frühen Krankheitsphase, in welcher IFN-beta-1b als Mittel der 1. Wahl zur Therapie zugelassen ist und wurden routinemäßig nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie behandelt. Das Alter der Patienten lag zwischen dem 22. und 60. Lebensjahr und der EDSS-Score lag zu Therapiebeginn zwischen 1,0 und 2,5. Die Patienten wurden ausführlich mündlich und schriftlich über die Hintergründe und den Ablauf der Studie informiert. Dabei wurde von jedem Patienten das schriftliche Einverständnis für die Blutentnahme und die geplanten Untersuchungen eingeholt. Die Durchführung der Studie ist von

der zugehörigen Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt worden (Registriernummer: II HV 27/2003) und wurde gemäß der Deklaration von Helsinki [179] durchgeführt.

Die IFN-beta-1b-Therapie wurde in der Standarddosis von 250 µg s.c. alle zwei Tage verabreicht und routinemäßig in den ersten Wochen mittels Betaferon®-*Titrationspack* eingeschlichen, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Bei den ersten 3 Injektionen erhielten die Patienten eine Dosis von 62,5 µg s.c., welche innerhalb der ersten drei Wochen schrittweise auf die Enddosis gesteigert wurde. Die IFN-beta-1b-Therapie wurde über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr durchgeführt.

3.2.2. Messung der microRNA- und mRNA-Expression unter Interferon-beta-1b-Therapie

Die durchgeführte longitudinale, experimentelle Untersuchung basiert auf der genomweiten Messung der miRNA- und mRNA-Expression *in vivo* bei insgesamt 6 Patienten zu 4 definierten Zeitpunkten im Verlauf der IFN-beta-1b-Therapie (Abb. 4).

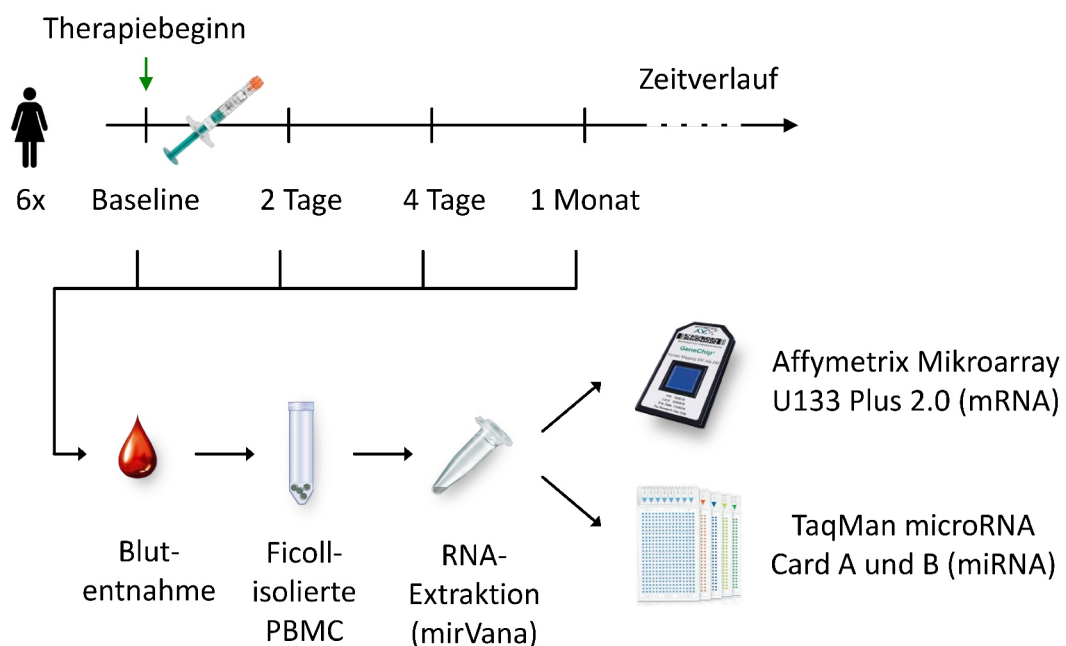


Abb. 4: Bildliche Veranschaulichung des longitudinalen Studiendesigns. Von 6 weiblichen Patienten wurden zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (vor Therapiebeginn= Baseline sowie zwei Tage, 4 Tage und einem Monat nach Therapiebeginn) Blutproben entnommen. Aus dem Blut wurden durch Aufbau eines Ficoll-Gradienten die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert und daraus die RNA extrahiert. Anschließend wurden die in diesen Proben enthaltenen mRNA und miRNA quantifiziert.

Die erste Probe wurde kurz vor dem Beginn der IFN-beta-1b-Therapie abgenommen, um die entsprechenden Expressionswerte als Ausgangspunkt (Baseline, t0) zu definieren. Des Weiteren wurden noch einmal nach zwei Tagen (t1), kurz vor der zweiten IFN-beta-1b Injektion, bzw. nach 4 Tagen (t2), vor der dritten Injektion, sowie nach einem Monat (t3) Blutproben entnommen. Aus insgesamt 24 Blutproben wurden die miRNA- und mRNA-Expressionslevel in den PBMC der MS-Patienten bestimmt. Die Laborarbeiten wurden im Institut für Immunologie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. Thiesen) durchgeführt.

3.2.2.1. Blutproben

Den Patienten wurden aus peripheren Venen 15 ml Blut in EDTA-Röhrchen zu den oben genannten 4 unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen. Aus den EDTA-Blutproben wurden, durch eine isopygnische Gradientenzentrifugation, dem sogenannten Ficoll-Hypaque-Gradienten [180], PBMC isoliert. Dabei werden die verschiedenen Blutzellen mit Hilfe eines hydrophilen Polysaccharids in verschiedene Schichten aufgetrennt. Am Ende erfolgte unter Verwendung des mirVana Kits von Ambion® die Lyse der PBMC mit anschließender RNA-Extraktion.

3.2.2.2. Quantifizierung der microRNA-Expression

Die Quantifizierung der microRNA erfolgte mittels dem etablierten Verfahren der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) [181], wobei für miRNA-Analysen spezielle TaqMan-Assays und *Primern* [182] existieren. In dieser experimentellen Studien wurden für die Messung der miRNA-Expressionslevel TaqMan Array Human MicroRNA Cards verwendet. Dabei liegen die PCR-basierten miRNA-Assays auf zwei verschiedenen Platten mit jeweils insgesamt 384 Assays, die gleichzeitig analysiert werden.

Zuerst mussten die aufbereiteten RNA-Proben mit Hilfe von „Megaplex RT“-*Primern* bearbeitet werden, um eine reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) durchzuführen. Anschließend wurde die cDNA in die Füllkammern des TaqMan-Arrays gegeben. In den Platten wurde dann mit Hilfe eines „Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR“-Systems eine *Real-Time-PCR* durchgeführt und somit die vorhandene miRNA in den Proben indirekt quantitativ gemessen.

Die erste Platte (*Card A*) besitzt 377 Assays für miRNA, wobei 9 dieser miRNA laut miRBase Version 17 nicht mehr gültig sind („*dead miRNA entries*“). Die verbleibenden 368 Assays detektieren 368 verschiedene humane miRNA. Außerdem enthält *Card A* einen Assay für eine Negativkontrolle (ath-miR159a) sowie 6 Assays für Positivkontrollen (U6, RNU44, RNU48). Die zweite Platte (*Card B*) besitzt 359 Assays für miRNA, wobei auch hier 7 miRNA nach der miRBase Datenbank Version 17 nicht mehr gültig sind. Mit den restlichen 352 Assays können die

Level von insgesamt 283 verschiedenen humanen miRNA bestimmt werden, da 69 miRNA auf dieser Platte doppelt gemessen werden. Von den 283 miRNA der *Card B* ist keine miRNA zusätzlich auf der *Card A* vertreten. Auch auf *Card B* befinden sich eine Negativkontrolle (ath-miR159a) und mehrere Positivkontrollen (U6, RNU6B, RNU24, RNU43, RNU44, RNU48). Insgesamt befinden sich auf beiden Platten zusammen 720 gültige miRNA-Assays, über welche insgesamt 651 verschiedene humane miRNA gemessen werden können.

3.2.2.3. Quantifizierung der mRNA-Expression

Um parallel die mRNA-Expression zu bestimmen, wurden sogenannte Oligonukleotid-Mikroarrays verwendet.

In der hier vorgestellten Studie wurde die Expression der mRNA in den PBMC-Proben der 6 Patienten mittels der Oligonukleotid-Mikroarrays „Affymetrix HG-U133 Plus 2.0“ gemessen. Diese Arrays ermöglichen die Analyse der Expressionslevel von über 19000 humanen Genen durch mehr als eine Million verschiedene Sonden. Eine Sonde besteht aus vielen gleichen Oligonukleotiden, welche der spezifischen, komplementären Bindung für Transkripte dienen [183]. Der Hersteller Affymetrix hat vom Chipdesign her vorgesehen, dass bei den Messungen für jedes Transkript mindestens 11 komplementäre Oligonukleotide (25nt) verwendet werden, die *in situ* auf den Arrays synthetisiert werden. Je mehr Oligonukleotide mit RNA aus der Patientenprobe hybridisieren, desto mehr Fluoreszenz kann gemessen werden, wodurch eine höhere Expression signalisiert wird [183].

Nach dem Protokoll wurde mittels reverser Transkription eine Umschreibung in cDNA durchgeführt. Die anschließende Hybridisierung sowie Fluoreszenzmarkierung des Probenmaterials erfolgte dann mit Hilfe des GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kits. Für die Messung und Auswertung der Fluoreszenz wurde ein hochauflösender GeneChip® Scanner 3000 eingesetzt. Zu allen insgesamt 24 PBMC-Proben wurden die Messungen durchgeführt, um Veränderungen im mRNA-Profil unter IFN-beta-1b-Therapie zu erfassen.

3.2.3. Auswertung der microRNA- und mRNA-Expressionsdaten

3.2.3.1. Vorverarbeitung und Normalisierung der erhobenen Daten

Zur Analyse der TaqMan-Messungen wurden zunächst mit Hilfe der Software SDS 2.3 und RQ Manager 1.2 von Applied Biosystems die sogenannten Ct (*Cycle Threshold*)-Werte für die einzelnen miRNA in den verschiedenen Proben bestimmt. Der Ct-Wert ist der Zyklus während einer PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Basisfluoreszenz einer Probe ansteigt. Je weniger RNA eines Gens in einer Probe enthalten gewesen ist, desto mehr Zyklen

sind notwendig, bis das Fluoreszenzsignal gegenüber dem Basissignal hervortritt und umso höher ist der Ct-Wert. Im Experiment wurden Daten bis zu einem Ct-Wert von 45 erhoben. In einem ersten Vorverarbeitungsschritt wurde ein oberer Grenzwert für die Ct-Werte (=38) eingeführt.

In einem nächsten Schritt wurden die logarithmischen Ct-Werte zur besseren Interpretation in eine lineare Skala transformiert. Dazu wurde folgende Formel angewandt: $\text{Daten}_{\text{linear}} = 2^{-\text{Ct}} \times 10^9$. Die Skalierung mit dem Faktor 10^9 wurde willkürlich gewählt, um extrem niedrige Werte zu vermeiden.

Um systematische Effekte, die im Experiment entstehen können und nicht auf biologischen Veränderungen basieren, auszugleichen, wurde eine Normalisierung der Daten durchgeführt. Dafür ist die sogenannte Loess-Methode [184] gewählt worden, ein etabliertes Verfahren zur globalen Normalisierung von Expressionsdaten [185]. Dieses lokal gewichtete, polynomiale Regressionsmodell, wurde bei den hier vorliegenden Untersuchungen genutzt, um jeweils die 4 Arrays einer Zeitreihe Patienten- und Array-spezifisch zu normalisieren. Diese „globale“ Normalisierung der Daten beruht nicht auf einzelnen Assays, sondern berücksichtigt alle Assays eines Arrays. Für eine Verbesserung der Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Patienten wurden die Daten zudem so verschoben, dass die 95% Quantile der Daten von *Card A* bzw. *Card B*, welche für jeden Patienten über alle 4 Zeitpunkte bestimmt wurden, gleich sind. Anschließend wurden die so normalisierten linearen Daten ($\text{Daten}^{\text{norm}}$) in normalisierte Ct-Werte (Ct^{norm}) rücktransformiert.

Auch die Daten zu den parallel durchgeführten mRNA-Messungen der PBMC-Proben wurden auf ihre Qualität hin begutachtet. Um detektierte Signale von vorbekannten nicht-spezifischen und nicht-sensitiven Sonden aus den erhobenen mRNA-Daten dieser Studie zu eliminieren, wurden sogenannte *Chip Definition Files* (CDF) von GeneCards [www.xlab.unimo.it/GA_CDF, Version 2.2.0] verwendet. Mit Hilfe der CDF konnte auf Basis der aktuellsten Genannotation ermittelt werden, welche Sonden 100% spezifisch und sensitiv waren. Durch Anwendung der CDF wurden nur die Daten von diesen Sonden berücksichtigt und die restlichen Sonden sind verworfen worden.

Des Weiteren wurden die mRNA-Daten mit dem MAS5.0 (*Microarray Suite* 5.0)-Algorithmus [186] von Affymetrix verarbeitet. In ihn gingen sowohl die Mikroarray-Rohdaten als auch die CDF für die Berechnungen ein. Je mehr Transkripte an die Oligonukleotidsonden gebunden haben, desto stärker waren die Signalintensitäten. Der MAS5.0-Algorithmus berechnete für jedes einzelne Gen die Expressionswerte mit Hilfe der Anwendung von Tukey's Biweight, ein Maß für den Mittelwert, das relativ robust gegenüber Ausreißerwerten ist, aus den Signalintensitäten der entsprechenden Sonden. Schließlich wurde daraus eine Expressionstabelle mit den Chips als Spalten und Genen als Zeilen erstellt. Dabei wurden die Signale der Sonden, die zu einem Gen gehören, zu einem einzigen Expressionswert verrechnet [187].

Auch die mRNA-Daten wurden mit Hilfe der Loess-Methode [184] normalisiert, um systematische Abweichungen, die bei der Hybridisierung der Affymetrix-Chips auftreten können, auszugleichen.

3.2.3.2. Filterung von unter Therapie differentiell exprimierten microRNA und mRNA

Die Filterung der Daten erfolgte, um miRNA bzw. mRNA zu identifizieren, deren Expression im Verlauf der IFN-beta-1b-Therapie signifikant verändert war und somit potentiell durch die Therapie beeinflusst wurde. Üblicherweise kann hierzu der sogenannte "logarithmische *Fold-Change*" (log-FC) betrachtet werden. Dieser ist definiert als der Logarithmus zur Basis 2 aus dem Quotienten der gemessenen Signalintensitäten zu zwei verschiedenen Proben, z.B. der Signalintensität zu einem Messzeitpunkt nach Therapiebeginn im Vergleich zur Baseline. Mit Hilfe des log-FC können veränderte Signalintensitäten und somit Expressionsänderungen von miRNA und mRNA quantifiziert werden. Im Falle der miRNA-Daten verhält er sich invers zu den Differenzen der Ct-Werte vor und unter Therapie. Der log-FC weist jedoch den Nachteil auf, dass seine relativen Abweichungen wegen dem zunehmenden Einfluss von Messungenauigkeiten bei abnehmender Signalintensität zunehmen [188]. Aus diesem Grund wurde hier die MAID-Filtermethode (*MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion*) [189] mit dem MAID-Score angewandt, welcher die Signalabhängigkeit in der Varianz des log-FC berücksichtigt. Mit dieser Methode wurde für jeden Zeitpunktvergleich sowohl für jede miRNA bzw. mRNA als auch für jeden Patienten ein MAID-Score berechnet. Der Betrag des MAID-Score ist für eine miRNA bzw. mRNA umso größer, je mehr sich ihre Expression nach Therapiebeginn verändert hat.

Damit in einem Zeitpunktvergleich die Expression einer miRNA als verändert angesehen wurde, musste diese miRNA bei mindestens 4 der 6 Patienten einen MAID-Score von unter -1,0 (Herab-Regulation) oder über 1,0 (Hoch-Regulation) aufweisen. Bei den Affymetrix-Daten wurde eine mRNA ab einem MAID-Score von unter -2,0 oder über 2,0 bei mindestens 4 Patienten als verändert exprimiert angesehen.

3.2.3.3. Analyse der Interaktionen von unter Therapie differentiell exprimierten microRNA und mRNA

Im Folgenden wurden die bei den Untersuchungen in ihrer Expression unter IFN-beta-Therapie verändert gemessenen miRNA und mRNA auf Übereinstimmungen zu Interaktionen aus den Datenbanken miRWalk [145] und miRTarBase [136] geprüft.

Dafür wurden für die gefilterten miRNA experimentell ermittelte miRNA-mRNA-Interaktionen aus miRTarBase sowie algorithmisch vorhergesagte Interaktionen aus miRWalk entnommen und auf Interaktionen mit den in den Untersuchungen gefilterten mRNA geprüft. Bei miRWalk wurden die miRNA-mRNA-Interaktionen unter der Voraussetzung, dass mindestens 5 der 10 angebotenen Algorithmen die miRNA-mRNA-Interaktion konsistent vorhersagen, ermittelt. Die gesammelten Interaktionen wurden anschließend in einem Cytoscape-Netzwerk visualisiert. Dabei wurde das Netzwerk mit Hilfe des „spring-embedded“ Algorithmus von Cytoscape angeordnet.

Es wurde ferner geprüft, ob herunterregulierte miRNA mit hochregulierten mRNA bzw. hochregulierte miRNA mit herunterregulierten mRNA im Netzwerk verbunden sind, um nähere Erkenntnisse zur posttranskriptionellen Regulation von IFN-beta-responsiven Genen durch miRNA zu gewinnen. Dazu wurden sowohl miRNA als auch mRNA im Netzwerk so dargestellt, dass die Richtung der Expressionsänderung ersichtlich ist. Unter Therapie hochregulierte mRNA und miRNA wurden rot, herunterregulierte miRNA und mRNA grün markiert. Außerdem wurde recherchiert, welche Rolle die gefilterten miRNA in der Regulation von IFN-beta-responsiven Genen und bei MS spielen. Hierfür wurde eine Literaturrecherche bezüglich der potentiell durch miRNA regulierten Gene auf Assoziationen zu IFN-beta sowie MS durchgeführt. Dazu wurde in PubMed nach den Schlagworten „MX1“, „RSAD2“, „STAT1“, „multiple sclerosis“, „EAE“, „T cell“, „Interferon“ sowie „IFN-beta“ gesucht.

4. Ergebnisse

4.1. Integrative Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Literatur-basierten, integrativen Analyse zu MS-assoziierten miRNA vorgestellt. Dabei wird insbesondere auf folgende Aspekte näher eingegangen: Charakteristika der MS-assoziierten miRNA, Interaktionen zu potentiellen Ziel-mRNA, potentielle die miRNA regulierende TF, Funktionen und Signalwege der potentiellen Zielgene sowie Expressionsprofile der miRNA in verschiedenen Zell- und Gewebetypen.

4.1.1. Multiple Sklerose-assoziierte microRNA aus der Datenbank miR2Disease

Aus der miR2Disease Datenbank [128] ließen sich (März 2012) 16 verschiedene MS-assoziierte miRNA aus 4 verschiedenen Studien (Keller *et al.* (2009) [129], Otaegui *et al.* (2009) [130], Du *et al.* (2009) [131] und Cox *et al.* (2010) [132]) entnehmen (Tab. 5). Allen Studien ist gemein, dass der Kontext der miRNA als Biomarker in Bezug zu MS in Blutzellen untersucht wurde. Die Besonderheiten dieser 4 Studien sind im Folgenden kurz dargestellt.

Die Gruppe um Keller *et al.* untersuchte mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays die Unterschiede in der miRNA-Expression von peripheren Blutzellen zwischen 20 RRMS-Patienten und 19 gesunden Kontrollen [129]. In dieser Studie wurden 10 miRNA gefunden (hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-422a, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-1275), welche in der MS-Gruppe signifikant dysreguliert waren.

Otaegui *et al.* konzentrierten sich auf die Relevanz von miRNA im Schubstadium von MS-Patienten [130]. Dabei wurden Blutproben von 20 Patienten im Schub, von 27 Patienten im Remissionsstadium, wie auch von 30 gesunden Probanden genommen. Im Anschluss wurden die Expressionslevel der miRNA in PBMC mit Hilfe von TaqMan *Real-Time*-PCR Arrays bestimmt. Die Analyse dieser Daten zeigte, dass die Konzentrationen von hsa-miR-18b-5p und hsa-miR-599 in der Patientengruppe im Schub im Vergleich zur gesunden Gruppe erhöht waren. Zusätzlich wurden erhöhte Konzentrationen von hsa-miR-96-5p als charakteristisches Merkmal für die Remissionsphase von MS beschrieben [130].

Du *et al.* analysierte mit Hilfe von *Real-Time*-PCR Leukozyten aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten und Kontrollen [131]. Hierbei wurden in der CD4⁺ T-Zell-Population erhöhte Expressionslevel von hsa-miR-326 bei Patienten im Schub, aber nicht in der Remissionsphase, gemessen. Im Rahmen derselben Studie wurde zusätzlich die miRNA-Expression in Mäusen mit

EAE untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression von hsa-miR-326 zu einer schwerer verlaufenden EAE mit vielen TH17-Zellen führte, während das *in vivo Silencing* von hsa-miR-326 eine mildere EAE-Form mit weniger TH17-Zellen auslöste. Auf diese Weise konnten Du *et al.* einen Einfluss von hsa-miR-326 auf die TH17-Zelldifferenzierung mit einem möglichen Beitrag an der Pathogenese von MS zeigen [131].

Cox *et al.* untersuchten etwa 700 miRNA in Vollblutproben von 59 Therapie-naiven MS-Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen und einer gesunden Kontrollgruppe (37 Personen) mittels Illumina Sentrix Arrays [132]. In allen MS-Subtypen waren hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant niedriger exprimiert. Zusätzlich bestätigten Cox *et al.* ihre Ergebnisse mittels *Real-Time*-PCR und lieferten Hinweise, dass hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p Regulatoren von Genen sind, welche möglicherweise eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung spielen.

4.1.2. Charakteristika der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Bei der Analyse der Lokalisation der 16 MS-assoziierten miRNA im Genom mittels den Informationen aus miRBase stellte sich heraus, dass 5 der 16 miRNA (hsa-miR-186-5p, hsa-miR-326, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-584-5p und hsa-miR-664a-3p) innerhalb von Introns von proteinkodierenden Genen liegen, während die restlichen 11 miRNA in Bereichen außerhalb von proteinkodierenden Genen lokalisiert sind. Außerdem besitzt keine der miRNA multiple Genloci, d.h. jede dieser miRNA geht aus nur einer einzigen Vorläuferform (pre-miRNA) hervor. Die pri-miRNA ist von 8 der 16 miRNA bekannt. Einige der 16 miRNA sind in Clustern organisiert. Das bedeutet, dass sie aus derselben pri-miRNA entstehen und gemeinsam transkribiert werden. Die beiden miRNA hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p gehören zu dem Cluster miR-17~92, wohingegen hsa-miR-18b-5p und hsa-miR-20b-5p dem Cluster miR-106a~363 zugehörig sind. Insgesamt wurden in den 4 Studien bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen für 13 miRNA erhöhte und für 3 miRNA erniedrigte Expressionslevel in Blutzellen gemessen (Tab. 5).

Tab. 5: Charakteristika der MS-assoziierten microRNA

reife miRNA	Literaturreferenz	Level MS/Kontrolle	Pre-miRNA	Pri-miRNA	Genkategorie
hsa-miR-17-5p	Cox et al. 2010	erniedrigt	MIR17	MIR17HG	intergenisch
hsa-miR-18b-5p	Otaegui et al. 2009	erhöht	MIR18B	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-20a-5p	Cox et al. 2010	erniedrigt	MIR20A	MIR17HG	intergenisch
hsa-miR-20b-5p	Keller et al. 2009	erniedrigt	MIR20B	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-96-5p	Otaegui et al. 2009	erhöht	MIR96	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-142-3p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR142	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-145-5p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR145	LOC728264	intergenisch
hsa-miR-186-5p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR186	ZRANB2	intragenisch
hsa-miR-223-3p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR223	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-326	Du et al. 2009	erhöht	MIR326	ARRB1	intragenisch
hsa-miR-422a	Keller et al. 2009	erhöht	MIR422A	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-491-5p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR491	KIAA1797	intragenisch
hsa-miR-584-5p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR584	SH3TC2	intragenisch
hsa-miR-599	Otaegui et al. 2009	erhöht	MIR599	unbekannt	intergenisch
hsa-miR-664-3p	Keller et al. 2009	erhöht	MIR664	RAB3GAP2	intragenisch
hsa-miR-1275	Keller et al. 2009	erhöht	MIR1275	unbekannt	intergenisch

Die miR2Disease-Datenbank [128] enthält 16 MS-assoziierte miRNA aus 4 verschiedenen Studien [129-132] (März 2012). Im Vergleich zu Kontrollen zeigten 13 miRNA erhöhte und 3 miRNA erniedrigte Expressionslevel im Blut von MS-Patienten. Weiterhin sind die offiziellen Symbole der miRNA-Vorläufertranskripte aufgelistet. Insgesamt liegen 5 von 16 miRNA in Introns von proteinkodierenden Genen.

Intergenisch= außerhalb von proteinkodierenden Genen; intragenisch= innerhalb von proteinkodierenden Genen; Level MS/Kontrolle= Level der miRNA-Expression von MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden; pre-miRNA= *precursor-microRNA*; pri-miRNA= *primary-microRNA*.

4.1.3. Interaktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA mit Zielgenen

Die 16 MS-assoziierten miRNA aus miR2Disease wurden mit Hilfe der beiden Datenbanken miRWalk und miRTarBase bezüglich potentiell regulierter Zielgene untersucht.

Durch miRWalk wurden insgesamt 121108 miRNA-mRNA-Interaktionen vorhergesagt. Dabei herrschte eine große Diversität in den Ergebnissen der verschiedenen Algorithmen (Abb. 5). Um die hohe Anzahl von Interaktionen für die weitere Analyse zu reduzieren, wurden nur Interaktionen berücksichtigt, welche von mindestens 7 der 10 Algorithmen (Kapitel 3.1.4) übereinstimmend vorhergesagt wurden. Neben einer Reduktion der Ergebnisse von 121108 auf 2122 potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen (Abb. 6 und 7) führte diese Bedingung auch dazu, dass für die vier miRNA hsa-miR-17-5p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-664a-3p und hsa-miR-1275 keine Interaktionen mehr übrig blieben. Zusätzlich wurden neben Algorithmen zur Berechnung von Ziel-mRNA auch experimentell validierte Zielgene in die Betrachtungen mit einbezogen.

	PITA	miRanda	TargetScan	miRWalk	DIANA-mT	RNAhybrid	miRDB	RNA22	PICTAR4	PICTAR5
# Vorhersagen	103179	82855	57799	42186	36872	7586	6619	5331	3086	962
PITA		71712	54016	38060	32861	4151	6373	4177	2909	917
miRanda			49840	40232	32493	3286	6445	3333	2930	929
TargetScan				34532	28674	2596	6481	2934	2788	911
miRWalk					29631	1811	6079	2330	2717	867
DIANA-mT						2064	5072	2567	2838	899
RNAhybrid							442	468	437	162
miRDB								472	1123	493
RNA22									327	124
PICTAR4										958

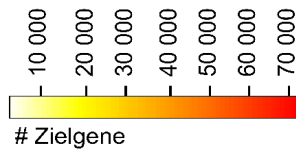


Abb. 5: Die Anzahl identisch vorhergesagter Zielgene für die 16 MS-assoziierten miRNA beim paarweisen Vergleich von je 2 Algorithmen. Das Farbschema in der Abbildung wurde genutzt, um die Anzahl gemeinsamer Interaktionen zwischen den Algorithmen visuell hervorzuheben. Dabei stehen helle Farbtöne für eine geringere Anzahl identisch vorhergesagter Interaktionen als dunkle Farbtöne. Hierbei zeigt sich die Diversität der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Algorithmen.

Vorhersagen= Anzahl der Vorhersagen.

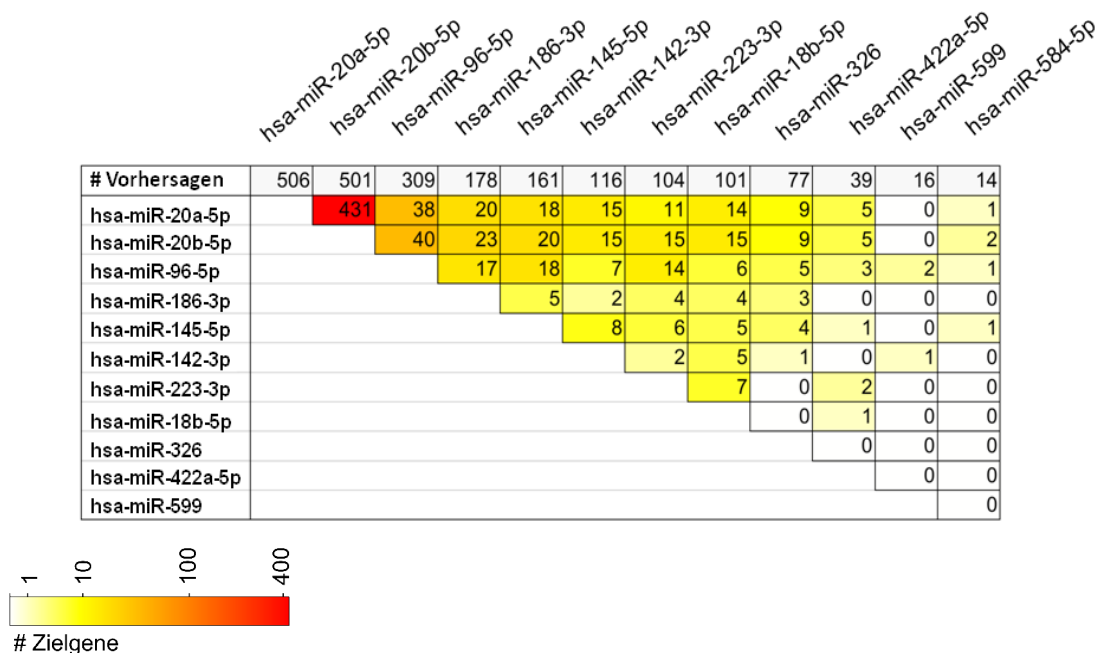


Abb. 6: Die Anzahl der mit Hilfe von miRWalk vorhergesagten Zielgene der MS-assoziierten miRNA (mod. nach [190]). Dunkle Farbtöne in der Abbildung verdeutlichen hohe Anzahlen an übereinstimmenden Zielgenen zwischen 2 miRNA, helle Farben wenige Übereinstimmungen. Da 4 der 16 miRNA unter der Voraussetzung, dass mindestens 7 Algorithmen konsistente Vorhersagen treffen, keine Interaktionen aufwiesen, sind nur 12 miRNA gelistet. Die beiden miRNA mit den meisten Zielgenen sind hsa-miR-20a-5p (n=506) und hsa-miR-20b-5p (n=501).

Vorhersagen= Anzahl der Vorhersagen.

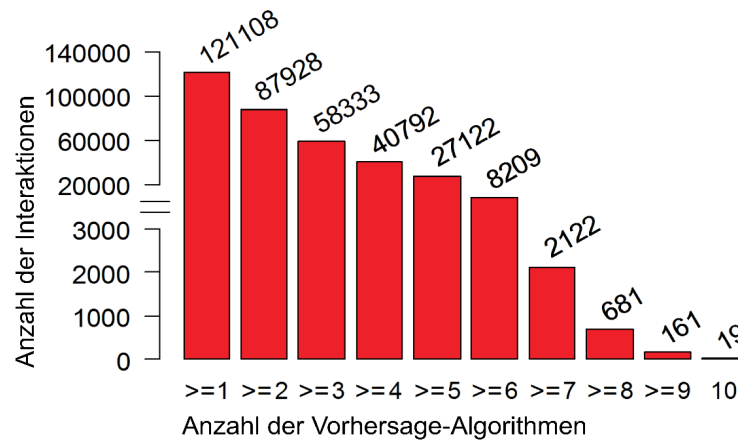


Abb. 7: Anzahl der miRNA-mRNA-Interaktionen, welche konsistent von mehreren Algorithmen berechnet wurden (mod. nach [190]). Insgesamt wurden bei der Anwendung aller 10 in miRWalk integrierten Algorithmen 121108 Interaktionen zu den 16 MS-assoziierten miRNA vorhergesagt. Diese hohe Anzahl kann durch die Einführung eines Filters reduziert werden. Unter der Voraussetzung, dass mindestens 7 Algorithmen übereinstimmende Vorhersagen zu einer Interaktion treffen müssen, blieben 2122 Interaktionen übrig. Bei der Einstellung, dass alle 10 Algorithmen übereinstimmende Vorhersagen treffen müssen, wurde die Anzahl der Interaktionen auf 19 reduziert.

Bei der Überprüfung der MS-assoziierten miRNA auf Interaktionen mit Hilfe der miRTarBase Datenbank waren für 12 der 16 miRNA Einträge vorhanden. Dabei konnten auch für hsa-miR-17-5p und hsa-miR-491-5p Zielgene nachgewiesen werden. Es gab keine experimentell validierten Interaktionen für hsa-miR-142-3p, hsa-miR-599, hsa-miR-664a-3p und hsa-miR-1275 in dieser Datenbank. Letztendlich konnten 117 validierte miRNA-mRNA-Interaktionen für die MS-assoziierten miRNA aus miRTarBase extrahiert werden (Tab. 6), von welchen sich 30 Interaktionen auch in der Ergebnisliste von miRWalk fanden. Durch die Anwendung beider Datenbanken wurden somit insgesamt 1498 Zielgene, welche über 2239 Kanten mit 14 verschiedenen miRNA verbunden sind, bestimmt. Die hsa-miR-664a-3p und hsa-miR-1275 wiesen weder in miRTarBase noch in miRWalk relevante Interaktionen auf. Die Daten sind mit Hilfe von Cytoscape als Netzwerk visualisiert worden (Kapitel 4.1.4). Die miRNA, die die meisten Interaktionen in dem Netzwerk aufweisen, sind hsa-miR-20a-5p mit 525 Kanten und hsa-miR-20b-5p mit 513 Kanten. Beide miRNA teilen sich außerdem einen Großteil ihrer potentiellen Ziel-mRNA ($n=434$), was ein entscheidender Hinweis auf ähnliche Funktionen ist (Abb. 6 und Tab. 6).

Tab. 6: Übersicht zu miRTarBase-gelisteten Interaktionen der MS-assoziierten microRNA

miRNA	# Interaktionen	Symbole der Zielgene
hsa-miR-17-5p	31	APP, BCL2, BCL2L11, BMPR2, CCL1, CCND1, CDKN1A, DNAJC27, E2F1, FBXO31, GPR137B, JAK1, MAP3K12, MAPK9, MEF2D, MUC17, MYC, NCOA3, NPAT, OBFC2A, PKD2, PTEN, PTPRO, RUNX1, SMAD4, TGFB2, THBS1, TNFSF12, VEGFA, YES1, ZNF1
hsa-miR-17-5p	1	ESR1
hsa-miR-20a-5p	19	APP, BCL2, BMPR2, BNIP2, CCND1, CDKN1A, E2F1, HIF1A, MAP3K12, MEF2D, MUC17, MYC, NRAS, PTEN, RUNX1, SMAD4, TGFB2, THBS1, VEGFA
hsa-miR-20b-5p	12	ARID4B, BAMBI, CDKN1A, CRIM1, ESR1, HIF1A, HIPK3, MUC17, MYLIP, PPARG, STAT3, VEGFA
hsa-miR-96-5p	8	ADCY6, CDKN1A, FOXO1, FOXO3, HTR1B, KRAS, MITF, PRMT5
hsa-miR-145-5p	24	BNIP3, CBFB, CDKN1A, CLINT1, DFFA, FLI1, FSCN1, HOXA9, IFNB1, IGF1R, IRS1, KLF4, KRT7, MUC1, MYC, MYO6, PARP8, POU5F1, PPP3CA, SOX2, STAT1, TIRAP, TMOD3, YES1
hsa-miR-186-5p	2	FOXO1, P2RX7
hsa-miR-223-3p	8	CHUK, E2F1, LMO2, MEF2C, NFIA, NFIX, RHOB, STMN1
hsa-miR-326	6	GLI1, MSH3, NOTCH1, NOTCH2, PKM2, SMO
hsa-miR-422	2	CYP7A1, CYP8B1
hsa-miR-491-5p	3	BCL2L1, CHD4, TAF10
hsa-miR-584-5p	1	ROCK1

In miRTarBase (Version 2.4) waren für 12 der 16 MS-assoziierten miRNA 117 Interaktionen enthalten. Gene, die von mehreren dieser miRNA reguliert werden, sind hervorgehoben. Bei 31 Genen gibt es den experimentellen Nachweis, dass eine Regulation durch hsa-miR-17-5p erfolgt, wobei 16 dieser Gene gleichzeitig Ziele von hsa-miR-20a-5p sind.

Interaktionen= Anzahl der Interaktionen.

Einige Ziel-mRNA werden im Netzwerk durch mehrere miRNA reguliert. Diese Top-Ziele mit den meisten miRNA-Interaktionen sind einer Analyse mittels Literaturrecherche unterzogen worden. Hierbei konnten Assoziationen bestimmter Zielgene zu MS und Immunprozessen aufgedeckt werden. Das Gen mit den meisten Interaktionen ist CDKN1A, welches im Netzwerk mit 5 der 14 miRNA, u.a. auch mit hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p, verbunden ist. Auch PTEN weist durch miRWalk vorhergesagte Interaktionen mit hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p auf. Obwohl für hsa-miR-17-5p von miRWalk keine Interaktionen vorhergesagt werden konnten, fand sich PTEN als Zielgen für hsa-miR-17-5p in miRTarBase. Des Weiteren schien STAT3 von zwei MS-assoziierten miRNA reguliert zu werden. Im Kapitel 5.1.2 wird näher auf diese Gene eingegangen.

4.1.4. Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit Multiple Sklerose assoziierten microRNA

Die 16 MS-assoziierten miRNA sind auf potentielle, sie regulierende TF untersucht worden, indem in miRGen 2.0 [151] gelistete potentielle TFBS entnommen wurden. Insgesamt sind 9322 potentielle TFBS für das gesamte menschliche Genom in miRGen 2.0 enthalten. Allerdings

waren nur für 12 der 16 MS-assoziierten miRNA TFBS-Einträge in der Datenbank vorhanden. Für hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-664a-3p und hsa-miR-1275 waren keine TFBS vertreten. Insgesamt konnten für die anderen 12 miRNA mit Hilfe von 74 TRANSFAC-PWM [165] 221 TFBS durch miRGen 2.0 vorhergesagt werden. Da 9 der 74 TRANSFAC-PWM nicht zu TF von Mensch, Maus oder Ratte gehörten, wurden sie bei den weiteren Betrachtungen außer Acht gelassen. Mit Hilfe von STAMP [170] sind die verbliebenen 65 PWM auf Ähnlichkeiten untersucht worden. PWM mit ähnlichen oder identischen Sequenzmotiven wurden in Gruppen zusammengefasst und somit die Anzahl der DNA-bindenden Motive auf 39, nachfolgend TF-Knotenpunkte genannt, konzentriert. Zum Beispiel gab es bei der Vorhersage für die TFBS von OCT-1 (POU2F1) drei ähnliche PWM, welche mit Hilfe von STAMP zusammengefasst werden konnten. Im Cytoscape-Netzwerk wurden schließlich insgesamt 39 TF-Knotenpunkte, welche über 163 Kanten mit 12 miRNA verbunden sind, visualisiert (Tab. 7 und Abb. 8).

Tab. 7: Ausgewählte TF mit Interaktionen zu den MS-assoziierten microRNA

Namen der TF nach TRANSFAC	Kanten	Offizielle Gensymbole der TF nach HGNC
OCT-1	12	POU2F1
FOXD3; HNF-3 beta; HFH-3; FREAC-7	12	FOXD3, FOXA2, FOXI1, FOXL1
HNF-4; ARP-1	11	HNF4A, NR2F2
PAX-4	11	PAX4
NKX2-5	10	NKX2-5
COMP1	9	
EVI-1	9	MECOM
HNF-1	7	HNF1A
PAX-6	7	PAX6
C-Rel; NF-kappa B; NF-kappa B (p65)	6	NFKB1, RELA, RELB, REL, NFKB2
USF; ARNT; c-MYC; MAX	6	USF1, USF2, ARNT, ARNT2, MYC, MAX
CART-1	5	ALX1
CHOP; C/EBP alpha	5	DDIT3, CEBPA
AP-1; NF-E2	4	FOS, JUN, JUND, FOSB, JUNB, ATF1-7, JDP2
HAND1; E47	4	HAND1, TCF3
HLF	4	HLF

Die Expression von miRNA kann durch Transkriptionsfaktor-Proteinkomplexe reguliert werden. Aus der Datenbank miRGen 2.0 [151] wurden für die 16 MS-assoziierten miRNA die potentiell sie regulierenden TF entnommen. Es wurde vorhergesagt, dass diese TF an die Promotorregion der pri-miRNA von mindestens einer der 16 miRNA binden. Für eine bessere Übersicht sind nur die TF dargestellt, welche Verbindungen zu mindestens 4 der MS-assoziierten miRNA haben. TRANSFAC-PWM [165] mit ähnlichen oder gleichen Sequenzmotiven wurden in Gruppen zusammengefasst.

HGNC= *HUGO Gene Nomenclature Committee*; TF= Transkriptionsfaktor.

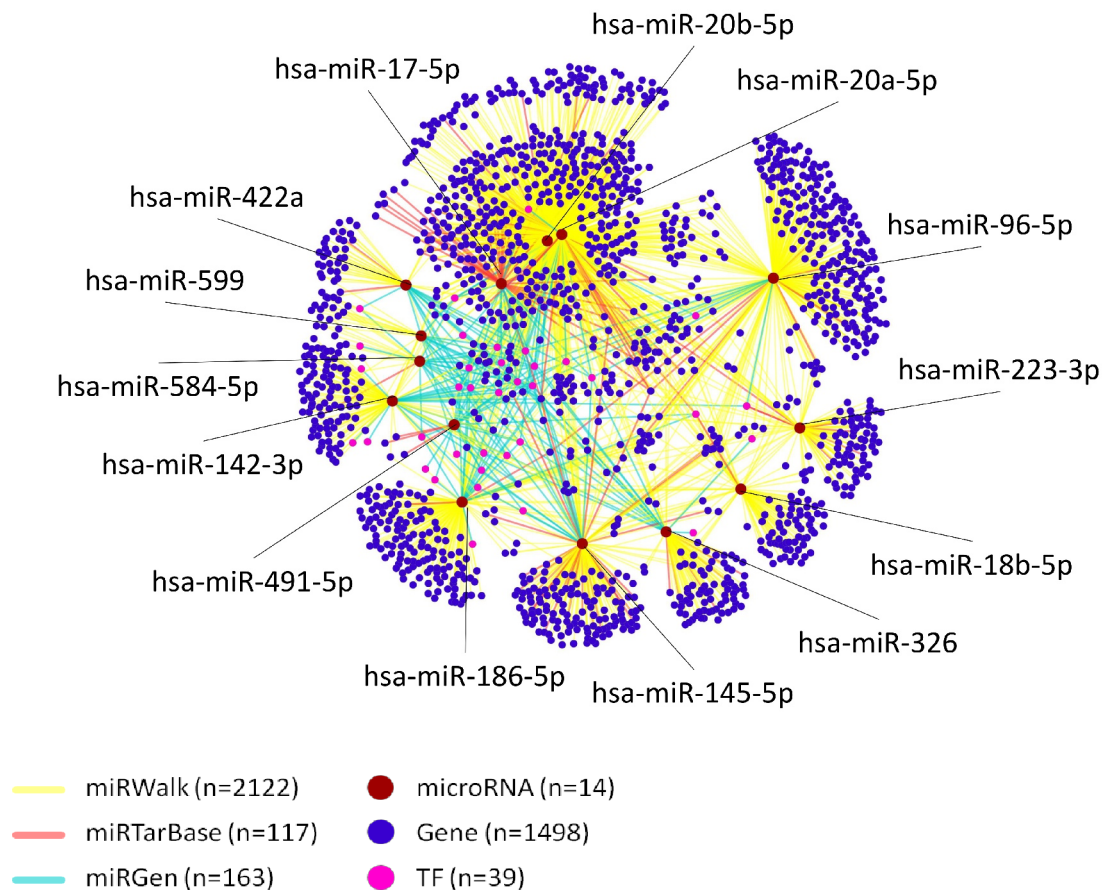


Abb. 8: Netzwerkvisualisierung der Interaktionen zwischen den MS-assoziierten miRNA, den Zielgenen und den Transkriptionsfaktoren (mod. nach [190]). TF-miRNA-Interaktionen wurden miRGen 2.0 entnommen. Validierte und vorhergesagte miRNA-mRNA-Interaktionen entstammen jeweils der miRTarBase bzw. der miRWalk Datenbank. Die miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p liegen nah beieinander und haben viele gemeinsame Zielgene. Es besteht außerdem eine enge Beziehung zu hsa-miR-17-5p, deren Ziele ausschließlich miRTarBase entnommen wurden und welche zu demselben miRNA-Cluster wie hsa-miR-20a-5p gehört. In dem Netzwerk existieren einige Rückkopplungsschleifen. So ist z.B. SOX9 sowohl ein regulierender TF als auch ein Zielgen von hsa-miR-145-5p.

n= Anzahl der Interaktionen, miRNA, Gene bzw. Transkriptionsfaktoren; TF= Transkriptionsfaktor.

Interessanterweise konnten 11 TF (ATF1, ESR1, HLF, HOXA5, HOXA9, FOXJ2, MYC, NFIA, NFIX, SOX9, YY1), die zu diesen 39 TF-Knotenpunkten zählen, identifiziert werden, welche gleichzeitig auch durch miRWalk oder miRTarBase als Zielgene der miRNA vorhergesagt wurden. Dies ist ein Ausdruck für das Vorhandensein von regulatorischen Rückkopplungsmechanismen im Netzwerk. Die TF wurden außerdem auf Assoziationen zu MS und dem Immunsystem hin untersucht. Bei der Literaturrecherche fielen hierbei insbesondere die TF AP1, NFkappaB und OCT-1, welche mit 4, 6 bzw. 12 MS-assoziierten miRNA im Netzwerk verbunden waren, auf (Kapitel 5.1.3).

4.1.5. Funktionsanalyse der Zielgene von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Die 1498 potentiellen Zielgene wurden mittels „*Gene Set Enrichment*“-Analyse mit KEGG-*Pathways* [174] und GO „*terms of the molecular function*“ [175] auf ihre biologischen Funktionen hin untersucht. GO und KEGG ordnen Gene bestimmten Signalwegen bzw. molekularen Funktionen zu. Dabei sind bei GO Hierarchien zu den verschiedenen Funktionsklassen hinterlegt. Zum Beispiel ist in der hier durchgeführten Analyse der Begriff „*protein kinase activity*“ eine Oberkategorie u.a. für die Funktionsgruppe „*protein serine/threonine kinase activity*“. Die Gene, welche in letzterer Gruppe gelistet sind, sind deswegen auch in der erstgenannten Gruppe enthalten. Mit der *Enrichment*-Analyse wurde getestet, ob Gene eines bestimmten Signalweges oder einer bestimmten molekularen Funktion in der Liste der potentiellen Zielgenen signifikant überrepräsentiert, also „angereichert“ sind. Die Funktionen und Signalwege der Zielgene wurden mit denen einer Referenzgenliste verglichen (siehe Kapitel 3.1.2.2). Im Ergebnis waren nach Filterung und Sortierung nach Odds Ratio und p-Wert insgesamt 4 Signalwege aus KEGG-*Pathways* und 11 Funktionsgruppen aus GO „*terms of the molecular function*“ in den Top 15 der überrepräsentierten Funktionen und Signalwege vertreten (Tab. 8).

Tab. 8: Top 15 der überrepräsentierten Funktionen und Signalwege der Zielgene

GO Term / KEGG Pathway	Zugriffsnummer	erwartete Anzahl	Anzahl	OR	p-Wert
<i>protein binding</i>	GO:0005515	598	821	2,2	$6,4 \cdot 10^{-39}$
<i>binding</i>	GO:0005488	1011	1149	2,4	$1,5 \cdot 10^{-25}$
<i>nucleic acid binding TF activity</i>	GO:0001071	82	160	2,3	$2,3 \cdot 10^{-17}$
<i>sequence-specific DNA binding TF activity</i>	GO:0003700	82	159	2,3	$4,9 \cdot 10^{-17}$
<i>enzyme binding</i>	GO:0019899	61	128	2,5	$2,2 \cdot 10^{-16}$
<i>TF binding</i>	GO:0008134	25	63	3,0	$8,0 \cdot 10^{-12}$
<i>MAPK signaling pathway</i>	KEGG:04010	21	54	3,0	$1,5 \cdot 10^{-10}$
<i>protein kinase activity</i>	GO:0004672	50	97	2,2	$1,6 \cdot 10^{-10}$
<i>protein serine/threonine kinase activity</i>	GO:0004674	36	76	2,4	$3,5 \cdot 10^{-10}$
<i>sequence-specific DNA binding</i>	GO:0043565	57	104	2,1	$5,6 \cdot 10^{-10}$
<i>pathways in cancer</i>	KEGG:05200	26	60	2,6	$1,0 \cdot 10^{-9}$
<i>transcription activator activity</i>	GO:0016563	27	60	2,6	$2,8 \cdot 10^{-9}$
<i>axon guidance</i>	KEGG:04360	10	31	3,7	$1,9 \cdot 10^{-8}$
<i>TGF-beta signaling pathway</i>	KEGG:04350	7	24	4,6	$2,5 \cdot 10^{-8}$
<i>protein domain specific binding</i>	GO:0019904	37	71	2,2	$4,6 \cdot 10^{-8}$

Auflistung der Top 15 überrepräsentierten Funktionen und Signalwege von GO „*molecular function*“ [175] und KEGG-*Pathways* [174] mit einer Odds Ratio über Zwei. Die Sortierung erfolgte anhand des p-Wertes des hypergeometrischen Tests, welcher mit Hilfe von GStats [177] berechnet wurde. Zum Beispiel gehören 160 der 1498 Zielgene zur GO-Kategorie „*nucleic acid binding TF activity*“ (Nukleinsäure-bindende TF-Aktivität), was signifikant mehr ist, als die erwartete Anzahl von 82 Genen auf Basis der Referenzgenliste.

OR= Odds Ratio

Für KEGG-*Pathways* erschien u.a. der MAPK-Signalweg (KEGG:04010) besonders auffällig. Insgesamt zählten 54 der 1498 Zielgene zu diesem Signalweg. Dies ist ein höherer Anteil als die Berechnung anhand der Referenzgenliste (erwartete Anzahl: 21) erwarten ließ (p-Wert: $1,5 \cdot 10^{-10}$). Beispielsweise gehören folgende Zielgene dem MAPK-Signalweg an: AKT3, CDC42, MAPK1, MAP2K1, MAP2K3, MAP3K12, MYC, TGFBR2 und TRAF6. Auch der TGFbeta-Signalweg (KEGG:04350) war deutlich überrepräsentiert mit 24 Genen und einer Odds Ratio von 4,64 (p-Wert: $2,5 \cdot 10^{-8}$). Zum TGFbeta-Signalweg gehören u.a. folgende Gene: ACVR1, E2F5, MAPK1, MYC, ROCK1, ROCK2, SMAD1 und TGFBR2. In der Zielgenliste war außerdem eine Vielzahl an Genen mit TF-Aktivität enthalten. Zum Beispiel gehören hierzu die Funktionsgruppen „*nucleic acid binding TF activity*“ (GO:0001071) mit 160 Genen und „*transcription activator activity*“ (GO:0016563) mit 60 Genen.

4.1.6. Expression von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA in verschiedenen Zellentypen und Geweben

Für die 16 miRNA, welche als potentielle MS-spezifische Marker in Blutzellen angesehen werden, gab es in der smirnaDB Datenbank [150] Expressionsdaten für 19 verschiedene Blutzellpopulationen und für 4 Hirnregionen. hsa-miR-142-3p war die am höchsten exprimierte miRNA in allen Zellpopulationen des peripheren Blutes. Eine andere miRNA, hsa-miR-223-3p, war vor allem in dendritischen Zellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert und zeigte eine relativ schwache Expression in anderen Zelltypen des Blutes und Gehirns. In den Hirngeweben war die Expression aller 16 MS-assoziierten miRNA sehr niedrig, wobei nach diesen Daten die miRNA hsa-miR-186-5p hier etwas höher exprimiert wird als die anderen miRNA. Einige miRNA, wie hsa-miR-599, konnten nicht detektiert werden, aufgrund der limitierten Sensitivität der Messtechnik, die genutzt wurde, um die Daten zu erheben [118]. In Abb. 9 wird ersichtlich, dass die Expressionsmuster von hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p in den Blut- und Hirnzellen, trotz sehr ähnlicher Nukleotidsequenzen und trotz, wie in Kapitel 4.1.3. erwähnt, vielen gemeinsamen vorhergesagten Zielgenen, doch recht unterschiedlich ausfallen. Die miRNA hsa-miR-20b-5p wird insgesamt nicht so stark exprimiert wie hsa-miR-20a-5p, welche vor allem relativ hoch in CD4⁺ T-Zelllinien exprimiert wird (*T-cell*-CD4-A301 und *T-cell*-CD4-ACH2). Hingegen zeigen hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p, welche beide dem Cluster miR-17~92 angehören, wie erwartet ähnliche Expressionsmuster. Bei diesen beiden miRNA findet sich neben der hohen Expression in CD4⁺ T-Zellen auch eine erhöhte Expression in Monozyten (*Monocytes*-CD14). In geringem Maß ließen sich hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p auch in B-Zelllinien nachweisen.

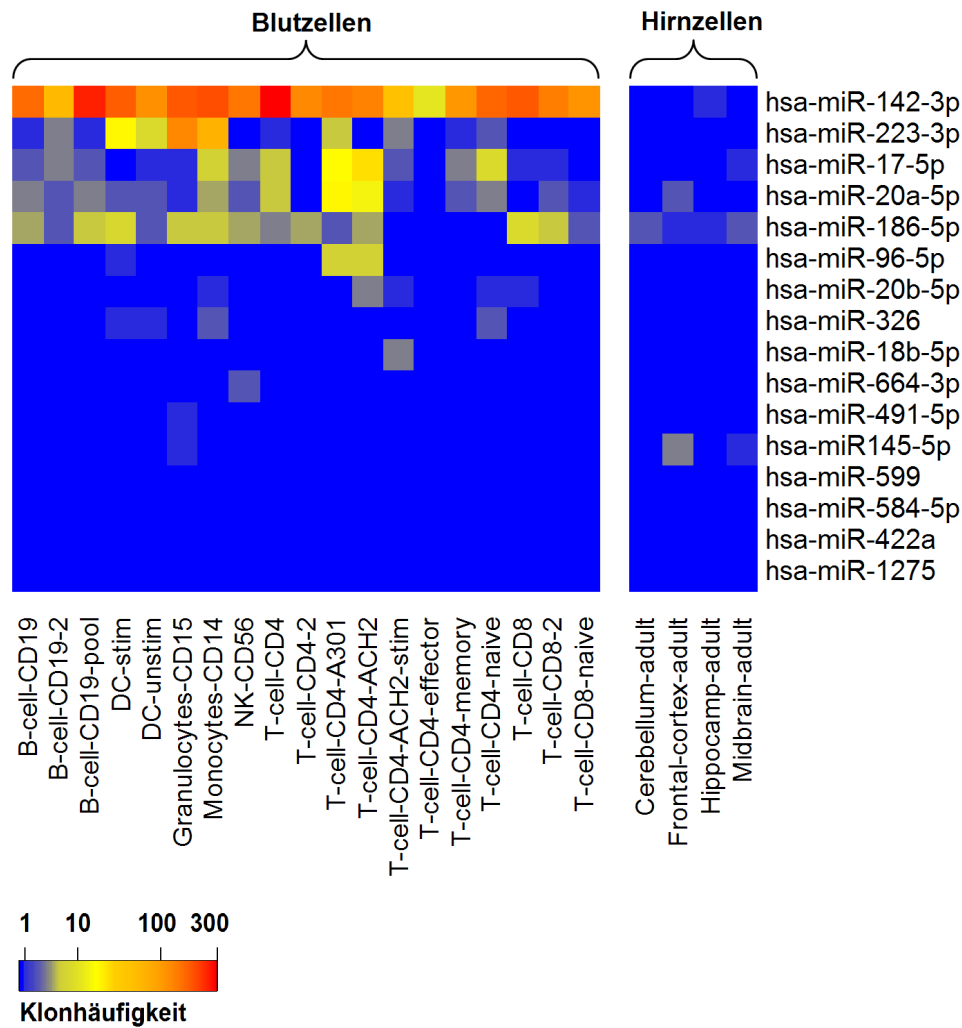


Abb. 9: Heatmap der Expressionslevel von den 16 MS-assoziierten miRNA (mod. nach [190]). Es sind die miRNA-Expressionslevel in 19 Blutzellpopulationen und in 4 Hirngeweben dargestellt. Diese Expressionsdaten wurden der smirnaDB Datenbank [150] entnommen und visualisiert. Die Nomenklatur der Zelltypen und Hirnzellen wurde aus der Studie von Landgraf *et al.* [118] übernommen. hsa-miR-142-3p war in allen Blutzelltypen hoch exprimiert, allerdings nicht in den Hirngeweben. Die Expression von hsa-miR-223-3p war besonders in den dendritischen Zellen (DC), Monozyten und Granulozyten hoch. In den Hirngeweben konnten einige MS-assoziierte miRNA mit der verwendeten experimentellen Methode der Studie, aus der die Daten stammen, nicht detektiert werden (Klonhäufigkeit= 0, blau dargestellt).

4.2. Analyse der microRNA-Expression im Blut von MS-Patienten unter Interferon-beta-1b-Therapie

4.2.1. Klinische Angaben zur Patientenkohorte

Bei der Untersuchung der insgesamt 6 weiblichen Patienten (MS01-MS06), lag der EDSS-Score zu Therapiebeginn im Durchschnitt bei $1,7 \pm 0,5$ (Mittelwert \pm Standardabweichung = MW \pm SA). Ein Jahr nach Therapiebeginn wurde der EDSS erneut erhoben, wobei sich dieser bei MS01, MS02 und MS04 als konstant zum Vorjahr erwies (Tab. 9).

Tab. 9: Schubereignisse und EDSS-Score der 6 Patienten im Zeitverlauf

Patient	EDSS (Baseline)	EDSS (nach 1 Jahr)	Schübe (im 1. Jahr)
MS01	1,0	1,0	0
MS02	1,5	1,5	0
MS03	1,5	1,0	0
MS04	2,5	2,5	0
MS05	1,5	2,5	0
MS06	2,0	1,0	2

Die Patienten MS03 und MS06 zeigten unter Therapie eine Besserung des EDSS-Scores, wohingegen MS06 innerhalb des ersten Jahres zwei Schübe erfahren hat. Bei MS05 kam es, trotz Ausbleiben eines Schubereignisses, zu einer Verschlechterung des EDSS-Scores von 1,5 auf 2,5. Durchschnittlich lag der EDSS-Score nach einem Jahr bei $1,6 \pm 0,7$ (MW \pm SA) und blieb damit relativ konstant im Vergleich zum EDSS-Score bei Therapiebeginn. Insgesamt konnten bei nur einem der 6 Patienten (MS06) Schübe verzeichnet werden, welche innerhalb des ersten halben Jahres nach Therapiebeginn auftraten. Bei diesem Patienten wurde die IFN-beta-1b-Therapie nach 13 Monaten, wegen durch Luciferase-Assay nachgewiesenen NAK und einer starken Zunahme der Anzahl an ZNS-Läsionen im MRT, abgebrochen und auf Fingolimod umgestellt. Die beiden Patienten mit KIS zeigten innerhalb des ersten Jahres keine Konversion in eine klinisch manifeste MS. Die IFN-beta-1b wurde von allen Patienten ohne schwerwiegende Nebenwirkungen gut toleriert.

4.2.2. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten

Die parallel erhobenen miRNA- und mRNA-Daten wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen und anschließend normalisiert, um systematische Messabweichungen weit möglichst herauszufiltern und deren Einfluss auf die Ergebnisse zu reduzieren. Insgesamt konnten nach der Normalisierung im Durchschnitt etwa 400 miRNA (Ct^{norm}) detektiert werden (Tab. 10), wobei

151 Assays (123 miRNA) von den 768 Assays (651 miRNA) in keiner der PBMC-Proben ein Fluoreszenzsignal zeigten. Die Daten stehen der Öffentlichkeit in der GEO (*Gene Expression Omnibus*)-Datenbank [191] unter der Zugangsnummer GSE46293 zur Verfügung.

Die Negativkontrolle ath-miR159a war auf allen Arrays (*Card A* und *B*) nicht messbar, wohingegen alle 30 Positivkontrollen (6 auf *Card A* und 24 auf *Card B*) in allen 24 PBMC-Proben detektiert werden konnten. Des Weiteren fiel bei der Qualitätskontrolle der miRNA-Daten auf, dass bei allen Proben die Expressionswerte bei *Card B* im Allgemeinen niedriger ausgefallen sind als bei *Card A*. Insbesondere zeigten die Daten von MS05 für alle 4 Zeitpunkte auf *Card B* niedrigere Werte als die der anderen Patienten (Tab. 10). Das heißt, es lagen hier viele hohe Ct^{norm} -Werte vor, weswegen einige miRNA als nicht detektiert gewertet wurden ($Ct^{norm}=38$). Da jedoch alle 4 Zeitpunkte longitudinal vergleichbar waren, wurden diese Daten unter Vorbehalt weiterverwendet, in dem Bewusstsein, dass einige miRNA, die bei den anderen 5 Patienten detektiert wurden, bei MS05 unter der Detektionsgrenze lagen.

Tab. 10: Anzahl der detektierten microRNA für die 6 Patienten im Zeitverlauf

Patient	t0	t1	t2	t3
MS01	380	372	370	373
MS02	375	407	390	363
MS03	424	400	408	407
MS04	390	389	388	389
MS05	285	261	266	262
MS06	414	442	429	397

Anzahl der miRNA, die in den PBMC-Proben mit TaqMan *Real-Time*-PCR gemessen werden konnten. Systematische Unterschiede in den Rohdaten wurden durch die Loess-Methode für jeden Patienten und Plattentyp normalisiert. Insgesamt konnten im Durchschnitt pro Probe etwa 400 miRNA detektiert werden ($Ct^{norm}<38$). Die Anzahl der detektierten miRNA war bei Patient MS05 zu allen 4 Zeitpunkten niedriger.

t0= Baseline; t1= zwei Tage; t2= 4 Tage; t3= ein Monat nach Therapiebeginn mit IFN-beta-1b.

Des Weiteren fielen Schwankungen der Expressionswerte im Zeitverlauf, auf. Bei hohen Ct^{norm} -Werten traten diese Schwankungen stärker in Erscheinung als bei niedrigeren, insbesondere wenn die Ct^{norm} -Werte über 30 lagen. Es zeigte sich zudem, dass die höchst-exprimierten miRNA teilweise eine bis zu millionenfach höhere Expression aufwiesen als niedrig exprimierte miRNA (Abb. 10). Die PCR-Daten weisen somit einen hohen Wertebereich auf.

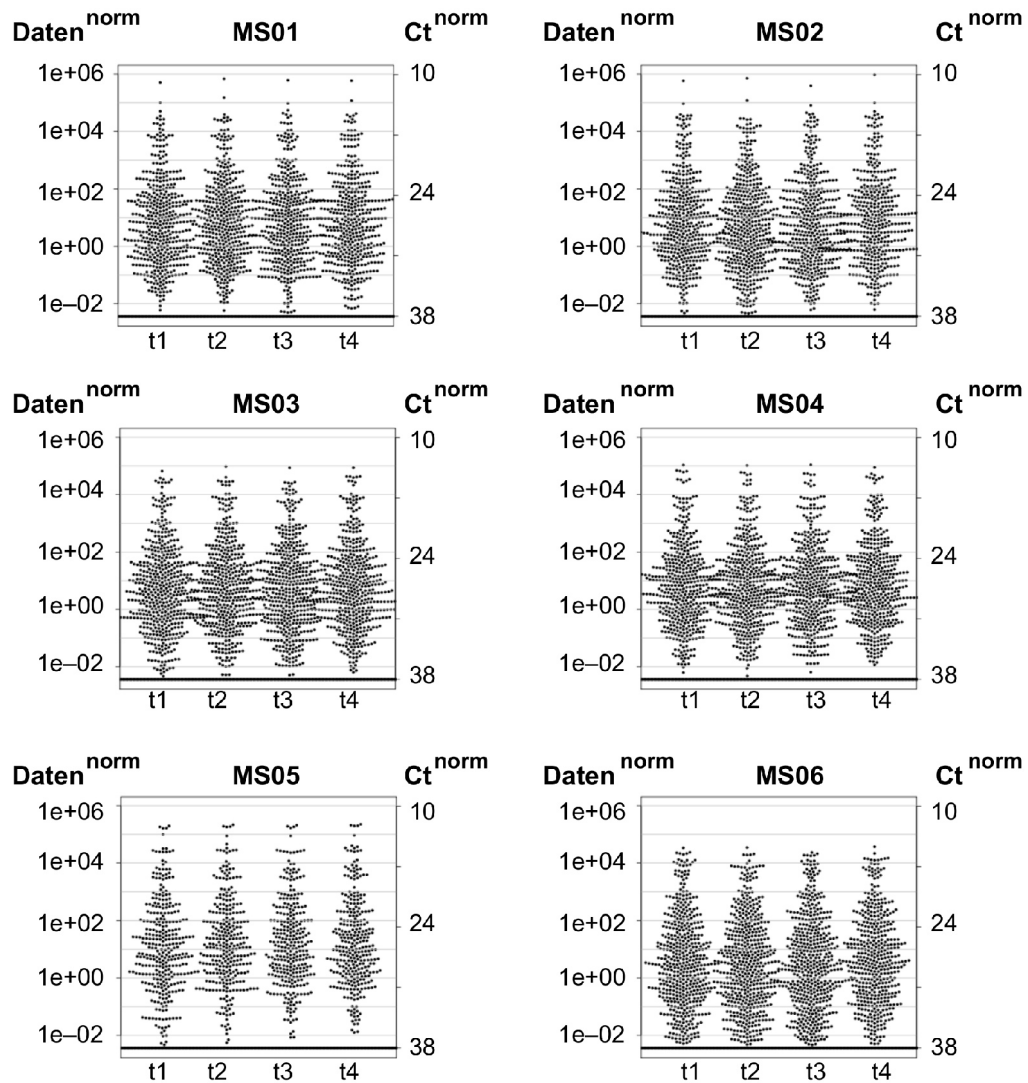
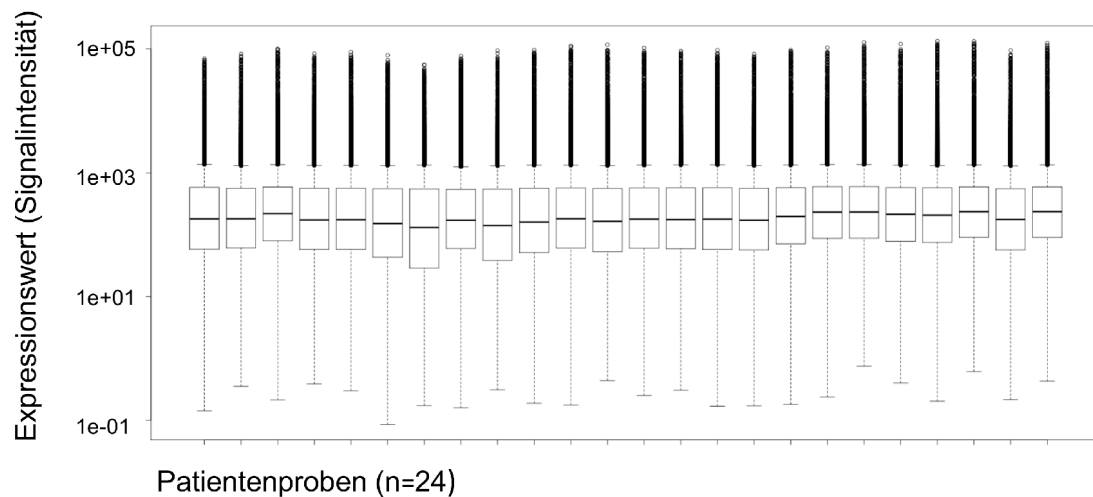


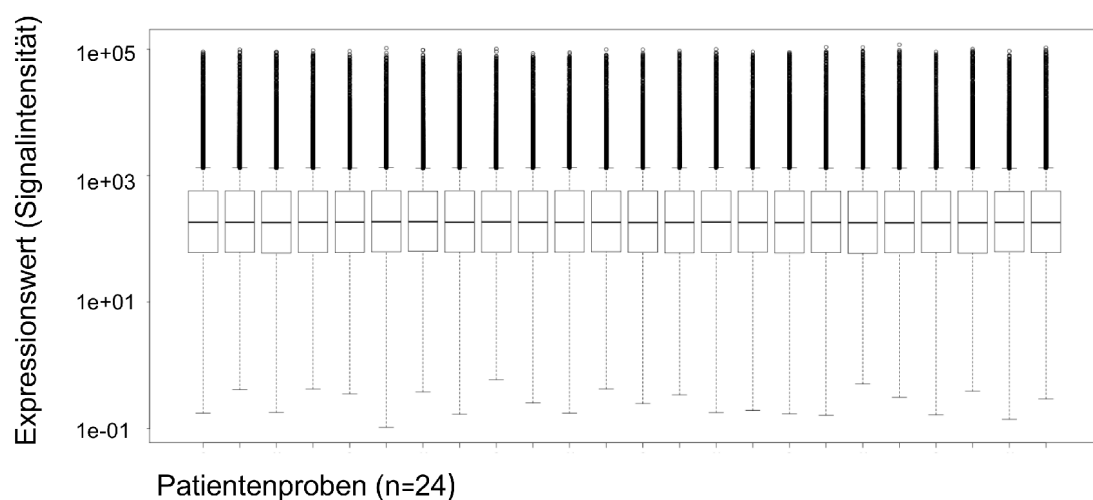
Abb. 10: Die normalisierten Daten aller gemessenen miRNA von allen 6 Patienten zu den 4 Messzeitpunkten. Es sind 768 Datenpunkte dargestellt (768 Assays für 651 miRNA). Auf der rechten Achse sind die Ct^{norm} -Werte und auf der linken Achse ihre entsprechende lineare Umformung ($Daten^{norm}$) aufgetragen. Die Werte liegen zwischen 10^{-2} und 10^6 . Es wird deutlich, dass die PCR-Daten einen hohen Wertebereich haben.

Ct^{norm} = normalisierter Ct-Wert (umgekehrt logarithmische Skala); $Daten^{norm}$ = normalisierte Daten (lineare Skala); t_0 = Baseline; t_1 = zwei Tage; t_2 = 4 Tage; t_3 = ein Monat nach Therapiebeginn.

Die Messungenauigkeiten der mRNA-Daten waren geringer als die der miRNA-Daten. Hier lagen die (linear-skalierten) Daten zwischen 10^{-1} und 10^5 (Abb. 11) und zeigten damit einen geringeren Wertebereich als die miRNA-Daten. Die Normalisierung verbesserte auch hier die Vergleichbarkeit der Daten (Abb. 11).



a)



b)

Abb. 11: Boxplot der Verteilung der mRNA-Expressionswerte vor und nach Normalisierung der Daten. Bild 11.a) zeigt die Verteilung der PBMC mRNA-Daten vor Normalisierung und Bild 11.b) nach Normalisierung. Die Daten wurden mit HG-U133 Plus 2.0 Mikroarrays von Affymetrix für die 6 Patienten (MS01-MS06) zu allen Messzeitpunkten erhoben. Auf der y-Achse ist die Verteilung der Expressionsdaten für die jeweiligen 24 Patientenproben aufgetragen. Die Daten liegen zwischen 10^{-1} und 10^5 und zeigen damit einen geringeren Wertebereich als die miRNA-Daten.

n = Anzahl der Patientenproben.

Die normalisierten miRNA-Daten wurden auf die am höchst-exprimierten miRNA analysiert. Dafür wurden über alle 24 PBMC-Proben die Mittelwerte der Ct^{norm} -Werte und die zugehörigen Standardabweichungen berechnet. Dabei fiel auf, dass in den PBMC-Proben allgemein hsa-miR-223-3p und hsa-miR-150-5p sehr hoch exprimiert waren (Tab. 11).

Tab. 11: Die Top 10 der am höchsten exprimierten microRNA

miRNA	TaqMan Assay-ID	Ct-Wert (Mittel)	Ct-Wert (SA)
hsa-miR-223-3p	hsa-miR-223-4395406	13,59	0,66
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-150-4373127	15,24	0,53
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-126-4395339	16,62	0,36
hsa-miR-191-5p	hsa-miR-191-4395410	16,84	0,26
hsa-miR-19-3p	hsa-miR-19b-4373098	16,95	0,44
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-24-4373072	17,06	0,23
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-146a-4373132	17,47	0,39
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-16-4373121	17,49	0,31
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-17-4395419	17,66	0,25
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-106a-4395280	17,69	0,25

Die Standardabweichungen der Ct^{norm} -Werte erscheinen moderat. hsa-miR-223-3p war die am höchsten exprimierte miRNA mit einem durchschnittlichen Ct^{norm} -Wert von $13,59 \pm 0,66$ (MW \pm SA). Taqman Assay-ID= TaqMan Assay Identifikationsnummer der miRNA.

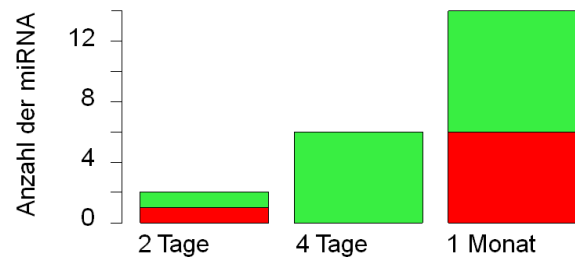
Ct-Wert (Mittel)= Mittelwert aller Ct^{norm} -Werte. Ct-Wert (SA)= Standardabweichung aller Ct^{norm} -Werte.

4.2.3. Unter Therapie differentiell exprimierte microRNA und mRNA

Die 24 PBMC-Proben wurden mittels TaqMan-Arrays und Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 Mikroarrays auf Expressionsänderungen von miRNA und mRNA untersucht. Dazu wurden die miRNA- und mRNA-Daten auf Basis des MAID-Scores (siehe Kapitel 3.2.3.2) als differentiell exprimiert gefiltert. miRNA und mRNA wurden gefiltert, wenn sie bei mindestens 4 der 6 Patienten zu einem Zeitpunkt unter Therapie deutlich höher oder niedriger exprimiert waren als vor Therapiebeginn. Dabei ist zu beachten, dass der MAID-Score ein Signalintensitäts-abhängiger *Fold-Change* ist. Das bedeutet, dass bei niedrigen Expressionsniveau ein höherer *Fold-Change* gefordert wird, damit eine RNA als differentiell exprimiert gilt. Die Expressionslevel der RNA zu den drei verschiedenen Zeitpunkten in der frühen Phase der Therapie wurden immer mit den Baseline-Expressionswerten (t_0) verglichen.

Nach Anwendung der MAID-Score-Filterung fiel auf, dass insgesamt 20 der 651 gemessenen miRNA signifikante Veränderungen in ihrer Expression zeigten (Abb. 12). Es zeigten sich insgesamt mehr miRNA herunter- als hochreguliert. Nach zwei Tagen (t_1) zeigte sich eine miRNA (hsa-miR-874) hoch- und eine miRNA (hsa-miR-760) herunterreguliert. Nach 4 Tagen (t_2) ließen sich keine hochregulierten miRNA, dafür aber 6 herunterregulierte miRNA nachweisen (Tab. 12). Einen Monat nach Therapiebeginn (t_3) waren 6 miRNA hoch- sowie 8 miRNA herunterreguliert (Tab. 12). Somit waren zu diesem Zeitpunkt die stärksten Therapiebedingten regulatorischen Effekte nachweisbar. Interessanterweise fielen zwei miRNA auf, die sowohl nach 4 Tagen als auch nach einem Monat Therapie herunterreguliert waren (hsa-miR-149-5p und hsa-miR-708-5p).

Zeitpunktvergleich	Hoch	Herab	Gesamt
t1 vs t0	1	1	2
t2 vs t0	0	6	6
t3 vs t0	6	8	14
Gesamt	7	13	20



a)

b)

Abb. 12: Veränderung der Expression von miRNA im Zeitverlauf unter Therapie (mod. nach [192]).

In Abb. 12. a) sind die Anzahlen der differentiell exprimierten miRNA zu den entsprechenden Zeitpunkten dargestellt. Insgesamt zeigten unter Therapie 20 verschiedene miRNA Veränderungen in ihrer Expression. In Abb. 12. b) wird mit Hilfe eines Diagramms der Anteil der hoch- bzw. herunterregulierten miRNA pro Zeitpunktvergleich in Relation zur Baseline verdeutlicht (rot= hochreguliert; grün= herab-reguliert). Insgesamt wurden mehr herunter- als hochregulierte miRNA unter der IFN-beta-1b-Therapie beobachtet. Die meisten Veränderungen wurden nach einem Monat beobachtet.

Herab= herunterreguliert; Hoch= hochreguliert; t0= Baseline; t1= zwei Tage; t2= 4 Tage; t3= ein Monat nach Therapiebeginn.

Tab. 12: Differentiell exprimierte microRNA unter IFN-beta-1b-Therapie im Zeitverlauf

Reife miRNA	Assay-ID	t0t1	t0t2	t0t3
hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-4373169			Hoch
hsa-let-7b-5p	hsa-let-7b-4395446			Hoch
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-16-4373121			Hoch
hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-27a*-4395556		Herab	
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29a-4395223			Herab
hsa-miR-29b-1-5p	hsa-miR-29b-1*-4395276			Herab
hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-29c-4395171			Herab
hsa-miR-95	hsa-miR-95-4373011			Herab
hsa-miR-149-5p	hsa-miR-149-4395366		Herab	Herab
hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-181c*-4395444			Herab
hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-3p-4395361		Herab	
hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193a-5p-4395392		Herab	
hsa-miR-342-5p	hsa-miR-342-5p-4395258			Hoch
hsa-miR-346	hsa-miR-346-4373038			Hoch
hsa-miR-423-5p	hsa-miR-423-5p-4395451			Herab
hsa-miR-518b	hsa-miR-518b-4373246			Hoch
hsa-miR-532-5p	hsa-miR-532-5p-4380928		Herab	
hsa-miR-708-5p	hsa-miR-708-4395452		Herab	Herab
hsa-miR-760	hsa-miR-760-4395439	Hoch		
Hsa-miR-874	hsa-miR-874-4395379	Herab		

Liste der 20 miRNA, deren Expression sich zwischen den Zeitpunktvergleichen signifikant verändert hat. Die Filterung erfolgte mittels MAID-Score. Zwei miRNA (hsa-miR-149-5p und hsa-miR-708-5p) zeigten sich sowohl zu t2 als auch zu t3 in ihrer Expression in PBMC der Patienten unter Therapie mit IFN-beta-1b herunterreguliert.

Herab= herunterreguliert; Hoch= hochreguliert; t0= Baseline; t1= zwei Tage; t2= 4 Tage; t3= ein Monat; t0t1= Expressionsänderung von t0 zu t1; Analog t0t2 und t0t3.

Insgesamt konnten 95 von 19204 untersuchten mRNA mit Hilfe der MAID-Score-Filterung identifiziert werden, die sich unter Therapie in ihrer Expression verändert zeigten (Tab. 13). Zu Beginn waren nach zwei Tagen 10 mRNA (u.a. IFI6, IFI44L und SIGLEC1) hoch- und 4 mRNA (u.a. FCER1A) herunterreguliert. Nach 4 Tagen waren bereits 34 mRNA in ihrer Expression verändert, wovon 22 höher und 12 niedriger exprimiert waren. Im weiteren Verlauf stieg die Anzahl der differentiell exprimierten mRNA auf 66 an, wovon nach einem Monat 60 eine verstärkte und 6 eine verminderte Expression zeigten (Tab. 13). Bei diesen 95 mRNA, wovon viele Transkripte von bereits bekannten Typ I IFN-responsiven Genen sind (Kapitel 5.2.3), überwog über den gesamten Zeitraum der Anteil an hochregulierten gegenüber dem Anteil an herunterregulierten mRNA. Die stärksten Veränderungen in der Expression waren, wie bei den miRNA-Daten, nach einem Monat zu beobachten (Abb. 13). Vier Gene zeigten sich zu allen Zeitpunktvergleichen verändert. Dies sind FCER1A (herunterreguliert), IFI6, IFI44L und SIGLEC1 (alle hochreguliert). Daneben existierten 5 Gene, die sowohl 4 Tagen nach Therapiebeginn, als auch nach einem Monat eine erhöhte Expression zeigten (IFI44, RSAD2, IFIT1, IFI27 und MX1).

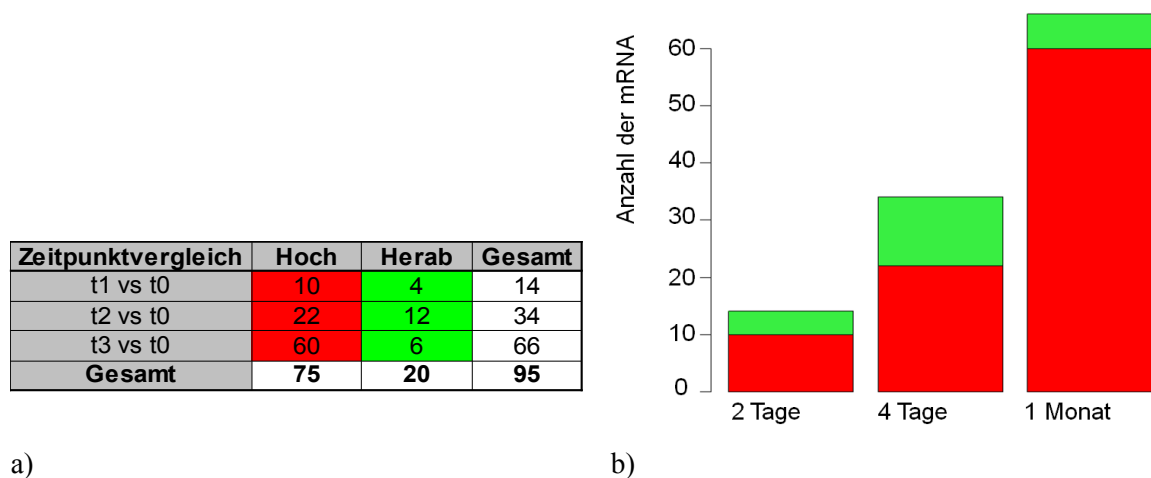


Abb. 13: Die mRNA-Expressionslevel im Zeitverlauf unter IFN-beta-1b-Therapie (mod. nach [192]). In Abb. 13. a) sind die Anzahlen der differentiell exprimierten mRNA zu den entsprechenden Zeitpunkten dargestellt. In den mRNA-Daten wurden insgesamt 95 Gene gefunden, deren Expression signifikant unter IFN-beta-1b-Therapie verändert war. Die meisten davon waren hochreguliert (n=75) und bekannte Typ I IFN-induzierte Gene. Die stärksten Veränderungen konnten nach einem Monat beobachtet werden. In Abb. 13 b) wird mit Hilfe eines Diagramms der Anteil der hoch- bzw. herunterregulierten mRNA pro Zeitpunktvorgleich in Relation zur Baseline verdeutlicht (rot= hochreguliert; grün= herab-reguliert).

Herab= herunterreguliert; Hoch= hochreguliert; t0= Baseline; t1= zwei Tage; t2= 4 Tage; t3= ein Monat nach Therapiebeginn.

Tab. 13: Veränderte Genexpression unter IFN-beta-1b-Therapie (mod. nach [192]).

Gensymbol	t0t1	t0t2	t0t3	Gensymbol	t0t1	t0t2	t0t3
AHR	Herab			IGJ	Hoch	Hoch	
ANKRD22			Hoch	IL1B		Herab	
APOBEC3A			Hoch	IL1R2		Hoch	
APOBEC3B			Hoch	IL8		Herab	
C10orf82	Herab			IRF7			Hoch
C3AR1	Hoch			ISG15			Hoch
CCL2			Hoch	ITGAE			Herab
CD163	Hoch	Hoch		JUNB		Herab	
CD38	Hoch		Hoch	LAP3			Hoch
CD83		Herab		LGALS2		Herab	
CDKN1C		Herab		LGALS3BP			Hoch
CHMP5			Hoch	LINGO3		Herab	
CLC			Herab	LOC391020			Hoch
CLEC4E		Hoch		LTF		Hoch	
CMPK2			Hoch	LY6E			Hoch
CTSL1			Hoch	MARCKS			Hoch
CXCL10			Hoch	MS4A4A			Hoch
CXCR4		Hoch		MT2A			Hoch
DDIT4		Hoch		MX1		Hoch	Hoch
DDX60			Hoch	MX2			Hoch
DDX60L			Hoch	NELL2	Herab		
DUSP6		Herab		NEXN	Hoch		Hoch
EGR1		Herab		NRGN			Herab
EGR2		Herab		OAS1			Hoch
EPSTI1			Hoch	OAS2			Hoch
FCER1A	Herab	Herab	Herab	OAS3			Hoch
FKBP5		Hoch		OASL			Hoch
GBP1			Hoch	PARP9			Hoch
GZMB			Hoch	PAX5			Herab
HBA1		Hoch		PLAC8			Hoch
HBA2		Hoch		PLSCR1			Hoch
HBB		Hoch		POM121L9P			Hoch
HBD		Hoch		RPL7			Hoch
HERC5			Hoch	RSAD2		Hoch	Hoch
HERC6			Hoch	RTP4			Hoch
IFI27		Hoch	Hoch	SAMD9L			Hoch
IFI35			Hoch	SCO2			Hoch
IFI44		Hoch	Hoch	SESN1		Hoch	
IFI44L	Hoch	Hoch	Hoch	SH3BGRL2			Herab
IFI6	Hoch	Hoch	Hoch	SIGLEC1	Hoch	Hoch	Hoch
IFIH1			Hoch	STAT1			Hoch
IFIT1		Hoch	Hoch	TNFSF10			Hoch
IFIT2			Hoch	TRIM22			Hoch
IFIT3	Hoch		Hoch	TSC22D3		Hoch	
IFIT5			Hoch	TUBA1A		Herab	
IFITM1			Hoch	USP18			Hoch
IFITM2			Hoch	XAF1			Hoch
IFITM3	Hoch		Hoch				

Insgesamt wurden 95 Gene beobachtet, die unter der IFN-beta-1b-Therapie Veränderungen in ihrer Expression in PBMC von MS-Patienten aufwiesen. Viele der aufgelisteten Gene sind bekanntermaßen durch Typ I Interferone induzierbar.

Herab= herunterreguliert; Hoch= hochreguliert; t0= Baseline; t1= zwei Tage; t2= 4 Tage; t3= ein Monat nach Therapiebeginn. t0t1= Veränderung der Expression zwischen t0 und t1; t0t2 und t0t3 analog.

4.2.4. Interaktionen zwischen den unter Therapie verändert exprimierten microRNA und mRNA

Weiterhin ist untersucht worden, ob regulatorische Interaktionen zwischen den 20 gefilterten miRNA und den 95 gefilterten Genen existieren. Hierfür wurden potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen den öffentlich zugänglichen Datenbanken miRWalk [145] und miRTarBase [136] entnommen. miRTarBase enthält in der Literatur beschriebene Interaktionen, wohingegen es sich bei miRWalk um mit Hilfe von Algorithmen berechnete Interaktionen handelt. Bei miRWalk sind nur Interaktionen in die weiteren Analysen eingegangen, die von mindestens 5 der 10 angebotenen Algorithmen übereinstimmend vorhergesagt wurden. Für insgesamt 34 der 95 Gene fanden sich so potentielle Interaktionen zu 15 der 20 miRNA. In den Ergebnissen zeigten sich dabei 74 algorithmisch vorhergesagte und zwei experimentell beschriebene Interaktionen. Einige bekannterweise durch Typ I IFN-regulierte Gene wie IFIT1, IFI27 und IFI44L, welche zu den gefilterten Genen gehörten, gehörten nicht zu den potentiellen Zielgenen der miRNA. Hingegen wird IFIT5 laut miRTarBase durch hsa-let-7b-5p reguliert. Die zweite aus miRTarBase entnommene Interaktion stellt eine Verbindung zwischen hsa-miR-16-5p und HERC6 dar.

Alle entnommenen Assoziationen sind mit Hilfe von Cytoscape als Netzwerk visualisiert worden (Abb. 14). Wie in dem Netzwerk aus Kapitel 4.1 wurden auch in diesem Netzwerk miRNA mit vielen gemeinsamen Zielgenen so angeordnet, dass sie eine geringere Distanz zueinander aufweisen. Es fielen u.a. die miRNA hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29c-3p, mit gemeinsamen Zielgenen wie SESN1, AHR, CXCL10 oder EPSTI1, aber auch hsa-let-7a-5p und hsa-let-7b-5p, mit den übereinstimmenden Zielgenen TNFSF10, IL8, XAF1 und SAMD9L, auf. Die miRNA mit den meisten Interaktionen im Netzwerk waren hsa-miR-16-5p und hsa-miR-532-5p, die zu jeweils 9 IFN-beta-responsiven Genen Kanten zeigten (Abb. 14).

Durch eine anschließende Literatur-basierte Recherche sollten potentielle Verbindungen der miRNA-assoziierten Gene zu MS bzw. zu Interferon-beta aufgedeckt werden, wobei hierbei insbesondere die Gene STAT1, MX1 sowie RSAD2 auffielen. STAT1 und MX1 waren im Cytoscape-Netzwerk mit jeweils einer miRNA (STAT1 mit hsa-miR-532-5p, MX1 mit hsa-miR-760) verbunden wohingegen RSAD2 Verbindungen zu zwei miRNA hatte.

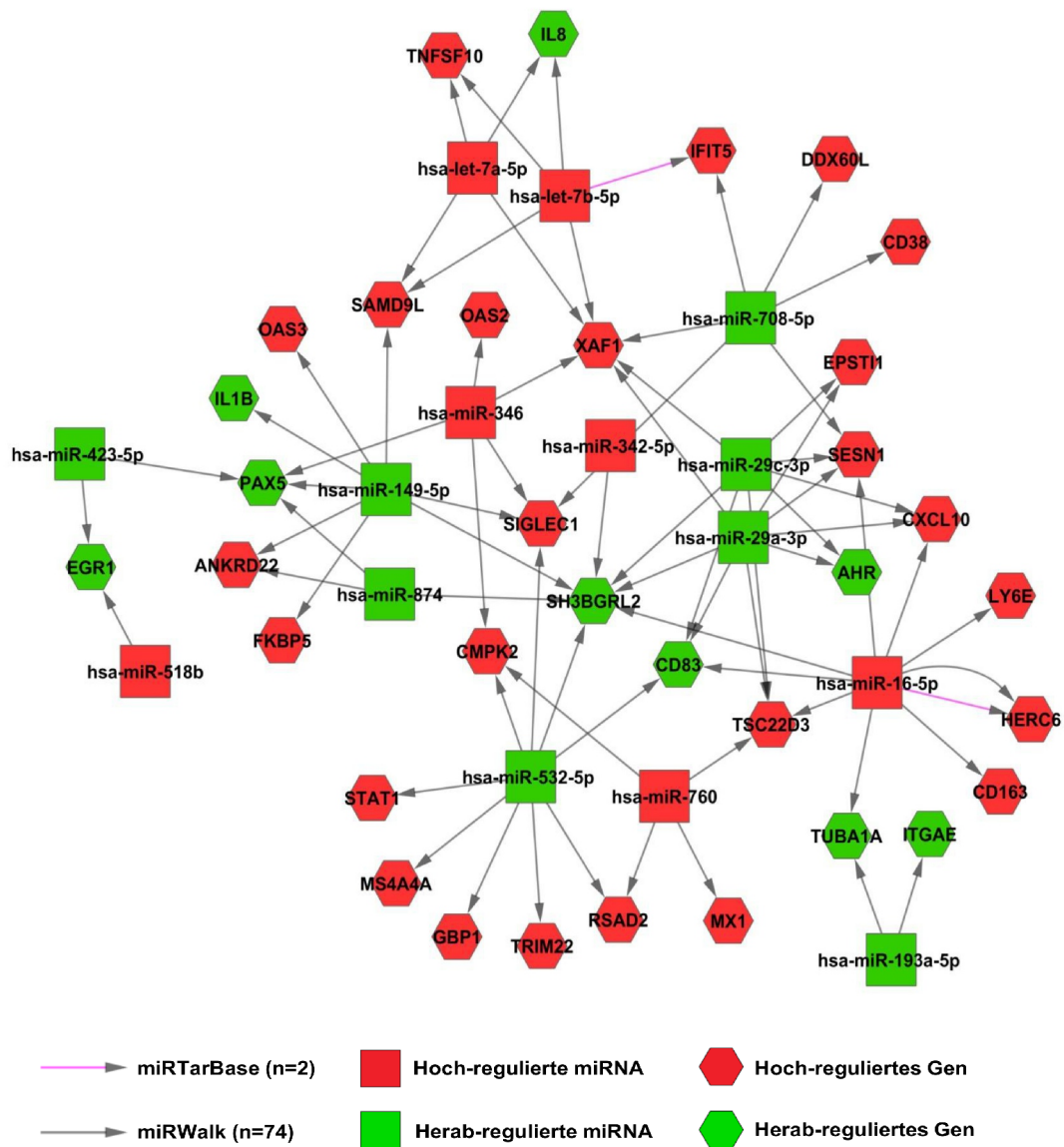


Abb. 14: Visualisierung der Interaktionen zwischen differentiell exprimierten miRNA und mRNA (mod. nach [192]). Die grauen Pfeile stehen für vorhergesagte Interaktionen aus miRWalk [145], die roten Pfeile für experimentell validierte Interaktionen aus miRTarBase [136]. Rote Kreise repräsentieren hochregulierte Gene analog wie rote Kästen hochregulierte miRNA darstellen. Es fällt auf, dass die herunterregulierte miRNA hsa-miR-532-5p potentiell viele unter IFN-beta-1b-Therapie hochregulierte Gene posttranskriptionell beeinflusst. In dem Netzwerk sind viele bekannte IFN-beta-induzierte Gene, z.B. STAT1, RSAD2 und MX1, enthalten.

n= Anzahl der Interaktionen.

5. Diskussion

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Literatur-basierten, integrativen Analyse der 16 MS-assoziierten miRNA evaluiert. Dabei wird auf die allgemeinen Charakteristika, potentiellen Zielgene, Signalwege, molekularen Funktionen und Expressionsmuster in Blut- und Hirnzellen dieser miRNA eingegangen sowie auf die sie potentiell regulierenden TF. Im zweiten Abschnitt des Kapitels wird der Fokus auf den experimentellen Teil dieser Arbeit gelegt. Dabei werden die Ergebnisse der longitudinalen, durchgeführten Studie zu Expressionsänderungen von mRNA und miRNA bei MS-Patienten unter einer Interferon-beta-1b-Therapie diskutiert. Im letzten Abschnitt werden, auf Grundlage der Ergebnisse der beiden vorangegangenen Teile der Arbeit und im Hintergrund weiterer Studien, miRNA als potentielle Biomarker im Kontext der MS betrachtet.

5.1. Diskussion zu der integrativen Analyse der Zielgene und Funktionen von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

5.1.1. Genomische Analyse der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Bei der Analyse der MS-assoziierten miRNA mit Hilfe der miRBase Datenbank wurden diese u.a. auf ihre Lokalisation im Genom hin untersucht. Dass laut miRBase 5 der 16 MS-assoziierten miRNA intronisch lokalisiert sind, ist konkordant zu vorhergehenden Studien, welche beschreiben dass etwa ein Drittel bis zur Hälfte aller miRNA-Loci innerhalb von Introns proteinkodierender Gene liegen [101]. Dies bedeutet, dass diese miRNA mit dem jeweiligen Wirtsgen eine Transkriptionseinheit bilden und somit gemeinsam reguliert und transkribiert werden [193].

Zusätzlich wurden durch Nutzung von miRBase auch die Vorläuferformen der miRNA ermittelt. Bei vielen reifen miRNA, welche in miRBase gelistet sind, ist die pri-miRNA-Form nicht bekannt. Dies liegt u.a. daran, dass diese Vorläuferformen kurzlebig sind und ausschließlich im Zellkern vorkommen, womit sie experimentell schwerer zu charakterisieren sind [151]. Bei der Untersuchung mit miRBase zeigte sich dies auch, da nur für 8 der 16 reifen miRNA pri-miRNA bisher beschrieben worden sind. Besonders bei den nicht intronisch (intergenisch) gelegenen miRNA sind die Vorläuferformen oft unbekannt [193]. Weitere Untersuchungen zum Nachweis der pri-miRNA wären wünschenswert. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich bereits speziell mit der Erfassung von Vorläuferformen der miRNA [193-195]. Dabei kommen auch

bioinformatische Algorithmen zur Berechnung potentieller pri- und pre-miRNA-Formen zum Einsatz [193, 194].

Die Organisation der miRNA hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p im Cluster miR-17~92 sowie der miRNA hsa-miR-18b-5p und hsa-miR-20b-5p im Cluster miR-106a~363 ist besonders interessant, da miRNA, welche aus demselben Cluster stammen, eine gemeinsame Vorläuferform aufweisen und somit gemeinsam transkribiert und reguliert werden [196]. Die beiden Cluster miR-17~92 und miR-106a~363 sind Paraloge, d.h. sie stammen evolutionsbiologisch vom selben Ursprungsgen ab. Aus diesem Grund weisen diese beiden Cluster starke Homologien auf und enthalten sequenziell sehr ähnliche miRNA. Dies ist ein Hinweis auf gemeinsame und ähnliche Zielgene bzw. Funktionen der entsprechenden miRNA [196]. Tatsächlich zeigen insbesondere die beiden miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p, die aus diesen verwandten Clustern stammen und sich in nur zwei Nukleotiden in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden, eine hohe Anzahl an übereinstimmend vorhergesagten und validierten Interaktionen auf (n=434). Obwohl hsa-miR-17-5p ebenfalls in nur zwei Nukleotid-Positionen von hsa-miR-20b-5p abweicht, existieren für diese unter den gegebenen Voraussetzungen hingegen keine Interaktionen in miRWalk. Das Cluster miR-17~92 ist bereits dafür bekannt, eine wichtige Stellung in der Differenzierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie in der B-Zellentwicklung einzunehmen und somit eine wichtige Rolle im Immunsystem zu spielen [121, 125]. Es wurde bereits im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten [197] und Lymphomen [198] diskutiert. Auch das paraloge Cluster miR-106a~363 Cluster wurde in der Vergangenheit mit MS [130, 129] in Verbindung gebracht. Da beiden Clustern ähnliche Funktionen zugesprochen werden, ist es nicht verwunderlich, dass Mitglieder dieser Cluster mit ähnlichen oder denselben Krankheiten in Verbindung stehen. Dies könnte in zukünftigen Studien validiert werden, indem gezielt die miRNA dieser Cluster z.B. mittels TaqMan Einzelassays in einer größeren Kohorte auf Expressionsunterschiede bzw. auf ihre Rolle als potentielle diagnostische oder *Staging*-Biomarker der MS hin untersucht werden. Dabei könnten sowohl die Expressionslevel dieser miRNA bei unterschiedlichen MS-Subtypen miteinander oder zu Gesunden verglichen werden.

5.1.2. Potentiell relevante Zielgene von microRNA bei Multiple Sklerose

Durch das zunehmende wissenschaftliche Interesse an miRNA, wurde eine große Anzahl verschiedener Datenbanken entwickelt, die sich mit unterschiedlichen Fragestellungen beschäftigen. Insbesondere bei Datenbanken zur Vorhersage von Zielgenen kann sich die Interpretation und der Umgang mit den vorhandenen Informationen durch die Varietät an Datenbanken als schwierig erweisen. Durch die große Anzahl der verschiedenen Herangehensweisen der vielen entwickelten Algorithmen zur Zielgen-Berechnung besteht eine gewisse Diversität zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Datenbanken. Oftmals errechnen

Algorithmen mehrere tausend potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen, wobei zu erwarten ist, dass auch eine hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse enthalten ist [199]. Eine weitere Herausforderung stellt die Aktualität einiger Datenbanken dar. Bei vielen Datenbanken kam es vor, dass nach der Entwicklung keine weiteren Aktualisierungen mehr durchgeführt wurden. Dies ist bei der Verwendung von miRNA-Datenbanken zusätzlich zu beachten und floss auch in die Entscheidung bei der Auswahl der verwendeten Datenbanken für die hier dargestellte Arbeit mit ein.

Eine mögliche Herangehensweise, um die hohe Zahl an vorhergesagten Interaktionen zu reduzieren ist, mehrere Vorhersage-Algorithmen für die Berechnung von Zielgenen simultan zu verwenden und sich auf die Ergebnisse zu konzentrieren, welche von mehreren Algorithmen konsistent vorhergesagt werden. Dieses Konzept („Ensemble Strategie“) wurde in dieser Arbeit angewandt. Durch die Bedingung, dass mindestens 7 von 10 möglichen Algorithmen konsistente Vorhersagen für eine miRNA-mRNA-Interaktion treffen müssen, wurde die hohe Anzahl der Interaktionen von 121108 auf 2122 reduziert (Kapitel 4.1.3). Dabei ist zu beachten, dass durch die Wahl der Anzahl an konsistenten Vorhersagen auch die Qualität der Ergebnisse beeinflusst wird. Eine zu niedrig gewählte Anzahl an Algorithmen kann dazu führen, dass biologisch relevante Interaktionen durch hohe Anzahlen falsch-positiver Ergebnisse in der Masse an Informationen untergehen. Bei zu streng gewählten Bedingungen könnten hingegen richtig-positiv vorhergesagte Interaktionen, welche nicht von der geforderten Anzahl an Algorithmen übereinstimmend berechnet werden, übersehen werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Balance zwischen strengen und schwachen Selektionskriterien zu finden und zusätzlich auch Datenbanken mit experimentell nachgewiesenen Interaktionen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Dies wurde in dieser Arbeit beachtet, allerdings sind bisher nur relativ wenige miRNA-mRNA-Interaktionen experimentell validiert und in Datenbanken wie miRTarBase zu finden. Es existieren mehrere tausend menschliche miRNA [101], welche wiederum jeweils viele Gene regulieren können [107]. Jede einzelne dieser Interaktionen experimentell nachzuweisen ist also sehr Kosten- und Zeit-intensiv. Mit der Zeit werden vermutlich immer mehr Interaktionen experimentell validiert und in die Datenbanken aufgenommen werden.

Die Zielgene, welche durch miRWalk [145] und miRTarBase [136] für die 16 MS-assoziierten miRNA vorhergesagt wurden, wurden durch Literaturrecherche näher studiert. Einige ausgewählte Zielgene (CDKN1A, E2F1, PTEN und STAT3) werden nachfolgend kurz vorgestellt.

CDKN1A ist mit 7 Kanten das Zielgen mit den meisten Interaktionen im Cytoscape Netzwerk. Für 5 der 16 MS-assoziierten miRNA wurde ermittelt, dass sie dieses Gen in der Expression posttranskriptionell regulieren. Dazu gehören auch die beiden miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p, welche sowohl nach den Berechnungen von miRWalk als auch nach der Literatur

[200] CDKN1A als Zielgen haben. CDKN1A ist dafür bekannt, die Einleitung der S-Phase in T-Zellen zu blockieren, weswegen es bei Dysregulationen dieses Genes zu autoimmunen Prozessen kommen kann [201]. Interessanterweise beschrieben de Santis *et al.* [202], dass auch die miRNA hsa-miR-25-3p und hsa-miR-106b-5p auf die CDKN1A-Expression wirken, damit den TGFbeta-Signalweg modulieren und dadurch die Reifung und Differenzierung von Treg-Zellen bei MS-Patienten beeinflussen.

Ein weiteres *Target-hub* bei der Analyse war der TF E2F1, welcher im Netzwerk durch 4 miRNA reguliert wird. Neben der Regulation des Überganges von der G1- zur S-Phase von Zellen wirkt E2F1 auch unterstützend bei der Regulierung des Grenzwertes für die Antigen-stimulierte T-Zellaktivierung sowie bei der negativen Selektion von autoimmunen, unreifen T-Zellen im Thymus [203]. Iglesias *et al.* [204] beobachteten, dass bei RRMS-Patienten in Monozyten aus dem peripheren Blut E2F1-abhängige Gene hochreguliert sind und dass Mäuse, welche E2F1-defizient sind, eine weniger stark zu Behinderungen führende Form der EAE entwickeln. In einer Studie von Riveros *et al.* [205] gehörte E2F1 zu den signifikant differentiell exprimierten TF im Blut von 99 unbehandelten MS-Patienten, deren TF-Expressionsmuster mit denen von 45 gesunden Personen verglichen wurden.

PTEN, welches 4 Interaktionen im Netzwerk aufweist, nimmt vermutlich eine kritische Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen ein. Diese Lipidphosphatase ist ein negativer Regulator des Phospho-Inositid-3-Kinase (PI3K) Signalweges, welcher insbesondere in T-Zellen die Signaltransduktion für Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion fördert [206]. Ein Mangel von PTEN in T-Zellen kann u.a. zu Autoimmunitäten [207]. Andererseits wurde auch ein positiver Einfluss eines PTEN-Mangels in den Oligodendrozyten des ZNS beschrieben, da der PI3K-Signalweg die Dicke und Integrität der Myelinscheiden um Axone beeinflusst [208]. Eine PTEN-inaktivierende Therapie von MS-Patienten wäre wegen dem gleichzeitig bestehenden Effekt auf T-Zellen vermutlich nicht sinnvoll. Johnson *et al.* (2008) beobachteten, dass CD8⁺ T-Zellen EAE-Mäusen ohne PTEN-Gen eine größere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli und gleichzeitig ein vermehrtes Proliferationsverhalten aufwiesen [209]. Gleichzeitig litten diese Mäuse an einem schwereren Verlauf der EAE [209]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PTEN die CD8⁺ T-Zellfunktion bei der EAE beeinflusst.

Das in dem Netzwerk von zwei miRNA regulierte STAT3 fördert das Überleben, die Proliferation sowie die Expansion von CD4⁺ T-Zellen [210]. Eine wichtige Funktion von STAT3 ist die Beeinflussung der Balance zwischen TH17- und Treg-Zellen, indem es einerseits inflammatorische Antworten in den TH17-Zellen fördert, andererseits aber überschießende Reaktionen durch Unterstützung der Treg-Zell-vermittelten TH1-Suppression verhindert [211]. In den TH17-Zellen trägt zur Vermittlung einer entzündlichen Reaktion bei, indem es an proinflammatorischen IL-Rezeptor-Signalwegen teilnimmt oder als TF an die Promotorregion

wichtiger Gene für die TH17-Differenzierung bindet und deren Expression steigert [211]. In einer Studie entwickelten STAT3-defizienten Mäusen eine Resistenz gegenüber der EAE [212]. Eine andere Forschungsgruppe zeigte, dass sich bei Patienten mit KIS und erhöhten Konzentrationen von phosphorylierten STAT3-Proteinen in CD4⁺ T-Zellen ein frühzeitiger Übergang in eine klinisch manifeste MS beobachten lässt [213]. Dagegen fördert STAT3 in Treg-Zellen die Expression von TH17-supprimierenden Genen (IL10 und TGFβ) und ist selbst auch Teil des IL10-Rezeptor-vermittelten Signalweges [210]. Bei der Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen von MS-Patienten bemerkten Martinez-Forero und Kollegen, eine verstärkte Resistenz der Zellen gegenüber der immunsuppressiven Wirkung von IL10 im Vergleich zu gesunden Probanden [214]. Der IL10-Rezeptor-vermittelte Signalweg schien, als Folge einer fehlenden Phosphorylierung von STAT3 in Treg-Zellen, beeinträchtigt zu sein. Des Weiteren wurde das STAT3-Gen bei verschiedenen Genom-weiten Assoziationsstudien auf SNP hin untersucht. Dabei wurden Assoziationen von bestimmten SNP im STAT3-Gen zur MS hergestellt [15, 215].

Alle diese vorgestellten Gene konnten in der Vergangenheit mit MS, T-Zellen oder anderen Komponenten des Immunsystems in Verbindung gebracht werden. Die Rolle der MS-assoziierten miRNA bei der Regulation dieser MS-assoziierten Gene ist jedoch weiterhin unklar, da auch andere Faktoren Einfluss auf die Genexpression nehmen. Vermutlich ergibt sich hier ein komplexes Zusammenspiel aus Genetik (SNP, HLA-Typen), Umweltfaktoren und fehl-gesteuerten Immunreaktionen. Die genaue Stellung ausgewählter miRNA-mRNA-Interaktionen sollte in zukünftigen Studien gezielt analysiert werden.

5.1.3. Potentiell regulierende Transkriptionsfaktoren von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA

Bisher existieren nur einige wenige Datenbanken die sich explizit mit der Betrachtung regulierender TF von miRNA auseinandersetzen. TFBS im Genom werden bisher vor allem mittels bioinformatischen Algorithmen vorhergesagt und es existieren bisher nur wenige experimentell validierte TF-miRNA-Interaktionen. Für die Zukunft wären mehr experimentell nachgewiesene Interaktionen wünschenswert, z.B. durch sogenannte Chromatin-Immunpräzipitation Experimente. Einige Initiativen wie das ENCODE-Projekt versuchen bereits vermehrt TFBS, nicht nur bei miRNA, durch Experimente möglichst umfassend zu bestimmen [216].

Eine der Datenbanken, die TF für die Regulation von miRNA vorhersagt, ist miRGen 2.0, weshalb sie in dieser Arbeit für die Analysen der TF-miRNA-Interaktionen verwendet wurde (Kapitel 4.1.4). In der Literaturrecherche zu den mit Hilfe von miRGen 2.0 ermittelten TF, welche als potentielle Regulatoren der MS-assoziierten miRNA in Frage kommen, zeigte sich, dass einige dieser TF wichtige Rollen im Immunsystem einnehmen und somit einen Einfluss auf

die Pathophysiologie der MS haben könnten. Zum Beispiel waren die TF AP1 und NFkappaB mit 4 bzw. 6 der miRNA im Netzwerk assoziiert. Auch OCT-1 (POU2F1) wies mit 12 Kanten einen hohen Interaktionsgrad auf. AP1 ist gemeinsam mit NFkappaB und OCT-1 in der T-Zellaktivierung involviert, indem die IL2-Expression verstärkt wird, deren Dysregulation zu Autoimmunität führen kann [217, 218]. NFkappaB und AP1 zeigen außerdem überlappende Funktionen in der Regulation von pro-inflammatorischen Genen, z.B. TNFalpha und MMP9, welche in der Vergangenheit auch in Verbindung mit MS und EAE diskutiert wurden und an der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind [219, 220]. Hilliard *et al.* berichteten, dass NFkappaB-defiziente Mäuse eine erniedrigte T-Zellproliferation zeigen und dass diese Tiere einen milderen Verlauf der EAE erfahren [221]. Bonetti *et al.* fanden erhöhte Konzentrationen von AP1 und NFkappaB in den Oligodendrozyten von MS-Läsionen, was die Rolle dieser beiden Faktoren in der Pathophysiologie der MS zusätzlich unterstützt [222]. OCT-1 gehört zu der Gruppe der Octamer TF-Proteine und wirkt verstärkend auf die IL3-Transkription sowie zusätzlich hemmend auf die IL4-, IL5- und IL8-Transkription [223, 224]. Des Weiteren wurde OCT-1 in einer Arbeit von Riveros und Kollegen zu einer der 25 wichtigsten MS-assoziierten TF gezählt [205].

Im Netzwerk finden sich verschiedene Rückkopplungsschleifen. Unter den 39 TF-Knoten, welche potentiell MS-assoziierte miRNA regulieren, sind 11 TF enthalten, die gleichzeitig auch deren mögliche Zielgene darstellen (Kapitel 4.1.4). So zeigte sich, dass SOX9 potentiell die Expression von hsa-miR-145-5p reguliert, wobei SOX9 gleichzeitig potentielles Zielgen von hsa-miR-145-5p ist. Auch HLF wird potentiell posttranskriptionell durch hsa-miR-20a-5p unterdrückt, während es gleichzeitig als TF hsa-miR-20a-5p in seiner Expression beeinflusst. Diese Rückkopplungsschleifen sollten in zukünftigen Studien näher betrachtet und v.a. im Zusammenhang mit MS bewertet werden. Unter anderem könnte man versuchen, diese Interaktionen mittels Luciferase-Assays zu validieren. Die Existenz solcher Regulationsmechanismen zwischen miRNA und TF wurde schon in verschiedenen Studien beschrieben [225, 226]. Es wurden Rückkopplungsschleifen mit doppelt negativen Effekten beschrieben, bei denen ein TF hemmend auf die Expression einer miRNA wirkt, die wiederum selbst einen reprimierenden Effekt auf diesen TF ausübt. Zum Beispiel scheint hsa-miR-223-3p bei der Differenzierung von Granulozyten vom TF NFI-A gehemmt zu werden, wobei dieser wiederum durch hohe Level der miRNA hsa-miR-223-3p posttranskriptionell reprimiert wird [124]. Andererseits existieren auch einfach negative Schleifen, bei denen ein TF die Expression einer miRNA verstärkt, welche dessen Expression posttranskriptionell unterdrückt [225]. Insgesamt könnten diese Mechanismen zu einer präziseren Genregulation und damit zur Homöostase in einer Zelle beitragen. Ein weiterer Ansatz für zukünftige Studien könnte sein, zusätzlich die Interaktionen zwischen den die miRNA regulierenden TF und den vorhergesagten

Zielgenen zu analysieren und auf diese Weise weitere potentielle Rückkopplungswege im Netzwerk aufzudecken.

5.1.4. Funktionen und Signalwege, die von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA beeinflusst werden

Die Idee, die Funktionen von miRNA indirekt über die Funktionen ihrer Zielgene zu bestimmen, wurde schon von Webservern wie DIANA-miRPath [172] und MMIA [227] implementiert. Diese Tools bieten die Möglichkeit, molekulare Signalwege aufzudecken, welche durch miRNA beeinflusst werden, indem eine KEGG-basierte *Enrichment*-Analyse der Zielgene durchgeführt wird. In vorliegender Arbeit wurden diese beiden Tools jedoch nicht genutzt, sondern die *Enrichment*-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde mit KEGG-*Pathways* und GO-Termen der Kategorie „*molecular functions*“ gearbeitet. Es war auffällig, dass viele Zielgene eine Rolle in verschiedenen T-Zell-Signalwegen zu spielen scheinen (Kapitel 4.1.5.).

Unter anderem sind einige von ihnen im MAPK-Signalweg involviert. Dieser Signalweg, welcher durch die Beteiligung der drei Proteinkinasen p38, ERK und JNK gekennzeichnet ist [228], beeinflusst unterschiedliche Regulationsprozesse in T-Zellen, z.B. Apoptose, Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion (z.B. IFN-gamma, IL10 und IL17) [229]. Deshalb könnte der MAPK-Signalweg durchaus eine Rolle in der Pathogenese der EAE oder MS spielen, was in verschiedenen Studien untersucht wurde. So untersuchten Ferrandi *et al.* den Einfluss von JNK auf das Apoptoseverhalten verschiedener T-Zelltypen bei RRMS [230]. In dieser Studie, bei welcher auch die Expressionsmuster der PBMC von RRMS-Patienten mit denen von gesunden Probanden verglichen wurden, konnte eine Überexpression der MAPK-Signalkaskade-Gene ERK und JNK2 nachgewiesen werden [230]. Eine andere Forschungsgruppe zeigte eine verstärkte IL10- sowie eine verminderte IL17-Produktion in T-Zellen bei EAE-Mäusen mit deletierten JNK1 [231]. Zusätzlich wiesen die JNK1-defizienten Myeloidzellen im ZNS dieser Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber proinflammatorischen Zytokinen auf. Ferner wurde durch Noubade und Kollegen [232] der Einfluss des MAPK-Signalweges auf die IL17-Produktion in T-Zellen bei EAE-Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Hemmung von p38 die Entwicklung einer EAE prophylaktisch verhindern und einen positiv modulierenden Effekt auf Krankheitsaktivität und -verlauf nehmen kann.

Neben den Zielgenen, die an dem MAPK-Signalweg beteiligt sind, scheinen laut Funktionsanalyse (Kapitel 4.1.5.) mehrere Zielgene auch am TGFbeta-Signalweg beteiligt zu sein, welcher für seinen Einfluss in der T-Zelldifferenzierung bekannt ist [233]. TGFbeta hat in Abhängigkeit von der Anwesenheit bestimmter Zytokine eine duale Wirkung auf naive T-Zellen. In der Abwesenheit von IL6 unterstützt es die Treg-Zellentwicklung und inhibiert TH1/TH2-Antworten, womit es anti-inflammatorische Prozesse fördert. Ist allerdings IL6 vorhanden,

fördert TGFbeta die Differenzierung von TH17-Zellen, was zu gesteigerten inflammatorischen Antworten führt [233, 234]. Dies ist ein Hinweis dafür, dass TGFbeta ein wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der MS darstellt. Für die Initiation einer EAE bei Mäusen scheint TGFbeta ein essentieller Faktor zu sein. Mäuse, bei denen TGFbeta durch lokale Antikörperblockade ausgeschaltet wurde, zeigten eine Abwesenheit von TH17-Zellen und eine fehlende Entwicklung einer EAE trotz TH1-Zellantwort [235]. Meoli *et al.* [236] beschrieben in ihren Untersuchungen der PBMC von MS-Patienten Veränderungen des TGFbeta-Signalweges an verschiedenen Komponenten der Signalkaskade. Hierbei zeigten TGFbetaIII und SMAD4 erhöhte Proteinlevel, im Gegensatz zu SMAD7 und CDKN1A, deren Level erniedrigt waren [236]. Des Weiteren zeigten Luo *et al.* [237], dass die Synthese von TGFbeta im ZNS von EAE-Mäusen einige Tage vor dem Auftreten von Lähmungen erhöht ist. Eine systemische Therapie mit einem TGFbeta-Inhibitor führte zu einem Rückgang der Lähmungen, einer Reduktion der Anzahl pathogener T-Zellen sowie einer verminderten IL6 Produktion im ZNS [237].

Allerdings fiel nicht nur die Beteiligung vieler Gene an diesen beiden Signalwegen auf. Interessanterweise kodiert eine große Anzahl der Gene aus der miRNA-Zielgenliste für Proteine mit TF-Aktivität. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die MS-assoziierten miRNA eine Rolle als „Regulatoren der Regulatoren“ innerhalb von „*feed-forward*“ Regelkreisen einnehmen. Das bedeutet, dass die miRNA die Expression von TF posttranskriptionell regulieren, welche wiederum selbst die Expression von Genen verstärken oder abschwächen. Die miRNA können demzufolge einen zusätzlichen indirekten Effekt auf Ebene der Transkription von Genen haben [225, 226]. Dies könnte ein allgemeines Phänomen bei miRNA darstellen, da auch schon in anderen Studien von einer hohen Anzahl TF unter miRNA-Zielgenen berichtet wurde [238]. Tu und Kollegen beschrieben ein Vorgehen, wie man primäre (direkte) und sekundäre (indirekte) Ziele von miRNA analysieren kann [239]. Dabei werden die Gene als sekundäre Ziele bezeichnet, die Ziele von miRNA-regulierten TF sind. Eine Analyse dieser sekundären Ziele kann sinnvoll sein, da miRNA nicht nur die Destabilisierung von Ziel-mRNA bewirken können, sie können stattdessen auch die Translation einer mRNA hemmen, was trotz normaler Konzentrationen der primären Ziel-mRNA zu einer signifikanten Beeinflussung der Expression von Genen, die einem Signalweg oder TF nachgeschaltet sind, führen kann [239]. Die Analyse von solchen sekundären Zielgenen von miRNA war nicht Gegenstand dieser Arbeit, bietet aber ein interessantes Feld für weitere Studien, um mehr über die Regulationskreise und Wirkmechanismen von miRNA bei MS zu erfahren.

Zur allgemeinen Durchführung einer „*Gene Set Enrichment*“-Analyse sind einige Punkte kritisch anzumerken. Es sollte bedacht werden, dass die Genauigkeit der *Enrichment*-Analyse von der Genauigkeit der miRNA-mRNA-Interaktionen abhängt [238]. Die Ergebnisse können verzerrt werden, wenn in der Liste der vorhergesagten Interaktionen eine hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse enthalten ist. Aus diesem Grund ist es sinnvoll zu versuchen die Anzahl falsch-

positiver Interaktionen zu senken, z.B. indem, wie in dieser Arbeit, mehrere Algorithmen ein Zielgen konsistent vorhergesagt haben müssen, damit es für die Analyse berücksichtigt wird [238]. Ein weiterer Punkt ist, dass der genaue Effekt einer einzelnen miRNA auf die Expression eines bestimmten Gens schwer vorhergesagt werden kann [240]. So können zwar hohe Expressionslevel einer miRNA in einer Zelle vorliegen, wenn die zu regulierende mRNA gleichzeitig allerdings nur geringe Konzentrationen aufweist, ist der Effekt auf diese mRNA-Level als relativ gering einzuschätzen [240]. Hierfür wären gezielte Untersuchungen der Interaktionen zwischen miRNA und Zielgenen, z.B. mittels Luciferase Reporter Assay-Experimenten, sinnvoll und wichtig.

Wenn eine miRNA eine mRNA durch Degradation reguliert, können erhöhte Level dieser miRNA zu erniedrigten mRNA-Leveln führen. Bei den MS-assoziierten miRNA lagen bei MS-Patienten entweder erhöhte oder erniedrigte Expressionslevel vor (Tab. 5). Falls eine mRNA gleichzeitig von einer höher- und einer niedriger exprimierten miRNA kontrolliert wird, kann es zu dem Effekt kommen, dass sich die miRNA in ihrer Regulation beeinflussen. Aus demselben Grund ist es auch schwer, den Nettoeffekt der dysregulierten miRNA auf einen bestimmten Signalweg zu quantifizieren, zumal außerdem ein Gen innerhalb eines Signalweges entweder als Aktivator oder als Inhibitor wirken kann. Eine zusätzliche Herausforderung stellen die wechselseitigen Interaktionen inklusive der Rückkopplungsschleifen dar, welche zu verschiedenen sekundären Effekten führen können und somit das Auseinanderhalten von Ursachen und Wirkungen im Netzwerk erschweren. Die experimentelle Assoziation der Expression von miRNA zu Zellfunktionen wird auch noch in Zukunft eine Herausforderung darstellen. Aktuell ist zu dieser Thematik noch relativ wenig bekannt, da dieses Feld der Forschung noch sehr jung ist. Es existieren zwar Datenbanken wie DIANA-miRPath [172] und MMIA [227], die die Option anbieten Funktionen von miRNA indirekt über die Funktionen ihrer Zielgene zu bestimmen, eine Verlinkung von miRNA in funktionelle Datenbanken, z.B. KEGG [174] oder GO [175] ist nach bisherigen Wissenstand noch nicht bekannt. Vermutlich werden die Einflüsse der miRNA auf Zellfunktionen in zukünftigen Studien besonders im Fokus stehen und miRNA mit der Zeit auch verstärkt in solche funktionelle Datenbanken mit aufgenommen werden.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der hier präsentierten *Enrichment*-Analyse die Hypothese dieser Doktorarbeit, dass dysregulierte miRNA bei MS-Patienten die Entwicklung von pro-inflammatorischen T-Zelltypen fördern.

5.1.5. Expression der Multiple Sklerose-assoziierten microRNA in Blut und Hirn

Um die allgemeine Expression der 16 MS-assoziierten miRNA in Blutzellen und Hirngewebe zu vergleichen, wurden bereits erhobene Expressionsdaten aus der öffentlich zugänglichen Datenbank smirnaDB [150] verwendet. Die von dort entnommenen Daten von Landgraf *et al.*

[118] basieren auf den Sequenzanalysen von 692 menschlichen miRNA für 170 verschiedene Zelltypen und Gewebe (Kapitel 3.1.1.6).

Bei der Betrachtung der Expressionsdaten der 16 MS-assoziierten miRNA zeigte hsa-miR-142-3p in den Blutzellen die höchste Expression (Abb. 9). Außerdem war die Expression von hsa-miR-142-3p nicht nur in der Mikroarray-basierten Analyse von Keller *et al.* im peripheren Blut von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden verändert [129], es konnten auch in der Studie von Waschbisch *et al.* erhöhte Expressionsmuster von hsa-miR-142-3p in PBMC von RRMS-Patienten nachgewiesen werden [133].

In dendritischen Zellen, Monozyten und Granulozyten zeigte v.a. die miRNA hsa-miR-223-3p hohe Level. Die hohe Expression dieser miRNA in Granulozyten wurde schon in früheren Studien, v.a. im Zusammenhang mit der Granulopoese, beschrieben [124]. Außerdem gehörte hsa-miR-223-3p in den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit zu miRNA-Expressionsänderungen unter IFN-beta-1b-Therapie durchgeführt wurden (Kapitel 4.2), zu den am höchsten exprimierten miRNA in PBMC von MS-Patienten (Tab. 11).

In Abb. 9 wird außerdem ersichtlich, dass die Expressionsmuster von hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p in den Blut- und Hirnzellen, trotz sehr ähnlicher Nukleotidsequenzen und trotz, wie in Kapitel 4.1.3. erwähnt, vielen gemeinsamen vorhergesagten Zielgenen, doch recht unterschiedlich ausfallen. Die miRNA hsa-miR-20b-5p wird in Blutzellen insgesamt nicht so stark exprimiert wie hsa-miR-20a-5p. De Santis *et al.* beschrieb Veränderungen der Expression von hsa-miR-20b-5p in Treg-Zellen von MS-Patienten, so dass dessen Expression durchaus wichtig bei der Funktion von CD4⁺ Zellen sein könnte [202]. Jedoch wurden Treg-Zellen, welche schon häufig in Verbindung mit MS diskutiert wurden, bei der Erstellung des Expressionsatlas von Landgraf *et al.* nicht explizit berücksichtigt. Aus diesem Grund wären für die Zukunft T-Zelltyp-spezifischere Expressionsdaten als Grundlage einer solchen Analyse wünschenswert.

Die hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p zeigen sehr ähnliche Expressionsmuster in den verschiedenen Zelltypen. Dies war zu erwarten, da beide miRNA dem Cluster miR-17~92 angehören. Diese beiden miRNA zeigen neben der hohen Expression in CD4⁺ T-Zellen auch eine erhöhte Expression in Monozyten. In geringem Maß lassen sich hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p auch in B-Zellen nachweisen. Diese Ergebnisse sind konkordant zu dem aktuellen Kenntnisstand, nach welchem das miR-17~92 Cluster in all diesen Zelltypen wichtige Rollen bei der Entwicklung, Differenzierung und Funktion einnimmt [120, 123, 125] (Kapitel 1.2.3). Mit der Pathogenese von MS werden sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch B-Zellen und Monozyten in Verbindung gebracht [40,41] (Kapitel 1.1.2.4).

Einige der 16 miRNA lagen mit ihren Konzentrationen unter der Detektionsgrenze der Messmethode von Landgraf *et al.* Es ist jedoch festzustellen, dass die Methode der

Sequenzanalyse, die von Landgraf *et al.* für die Quantifizierung der miRNA-Expression in Zellen und Geweben angewandt wurde, nicht so sensitiv ist wie andere Methoden (z.B. PCR). Es wäre wünschenswert, dass weitere Studien zu miRNA-Expressionsprofilen in verschiedenen Geweben und Zellen folgen, um diese wichtigen Informationen zur Analyse von veränderten Expressionsprofilen, z.B. bei bestimmten Krankheiten, nutzen zu können.

Am Beispiel der Expressionsdaten von Landgraf *et al.* [118] konnte gezeigt werden, wie man öffentlich zugängliche Datenbanken wie smirnaDB [150] nutzen kann, um die Expression bestimmter miRNA in bestimmten Zelltypen zu vergleichen. Seit der Veröffentlichung von miRBase [99] Version 18 (November 2011) werden von miRBase miRNA-Expressionsdaten, welche auf *Deep Sequencing* beruhen, angeboten. *Deep Sequencing* ist eine Methode, bei der Millionen von RNA-Molekülen gleichzeitig sequenziert und quantifiziert werden können. Diese Methode ist sensitiver als andere Genexpressionsmessmethoden, wie Mikroarrays [241]. Die Daten aus der miRBase Datenbank sind jedoch bisher nicht Blutzelltyp-spezifisch, so dass diese Daten für die hier geplante Analyse nicht in Frage kamen. Eine weitere wichtige Quelle für öffentlich zugängliche Expressions-Datensätze stellt die GEO-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) [191] dar. Hier sind z.B. zwei der 4 Studien die Ausgangspunkt der Analysen dieser Arbeit waren zu finden. So sind die Mikroarray-Daten von Cox *et al.* [132] über 733 miRNA in 96 Vollblutproben, wovon 59 Proben von MS-Patienten waren, enthalten (Zugangsnummer: GSE21079). Auch die Studie von Keller *et al.* [129], bei deren Untersuchungen 863 miRNA in Blutzellen von 454 Proben, davon 23 von MS-Patienten, analysiert wurden (Zugangsnummer: GSE31568) ist in der GEO-Datenbank vertreten.

5.1.6. Einschränkungen in der Verwendung der Datenbank miR2Disease

Obwohl miR2Disease [128] eine sehr nützliche Datenbank ist, um Einblicke in Studien über MS-assoziierte miRNA zu erhalten, muss beachtet werden, dass nicht alle aktuellen Studien, die sich mit diesem Thema auseinander gesetzt haben, in dieser Datenbank bereits zu finden sind. Besonders Publikationen nach dem Jahr 2010 fehlen noch in miR2Disease [128]. Bei diesen fehlenden Studien wurden einige weitere miRNA mit MS in Verbindung gebracht, welche folglich nicht in die Untersuchungen dieser Arbeit eingeschlossen wurden.

Zum einen existieren Arbeiten die *post mortem* am Hirngewebe von MS-Patienten durchgeführt wurden. So befasste sich eine Arbeit von Junker *et al.* [242] mit der Untersuchung von miRNA-Profilen in aktiven und inaktiven ZNS-Läsionen von MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollproben. Hierbei wurden verschiedene hoch- bzw. herunterregulierte miRNA, wie hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-326, in aktiven Läsionen identifiziert. Eine andere Arbeitsgruppe um Noorbakhsh *et al.* beobachtete erhöhte Konzentrationen von hsa-miR-155-5p,

hsa-miR-338-3p und hsa-miR-491-3p in der weißen Substanz von verstorbenen MS-Patienten [243].

Neben solchen Untersuchungen mit Hirngewebe von MS-Patienten wurden weitere Studien durchgeführt, bei denen die miRNA-Expression in Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wurde. Dabei fielen weitere dysregulierte miRNA bei MS-Patienten auf, z.B. miRNA aus den Clustern miR-106b~25 und miR-17~92 sowie die miRNA hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27b-5p, hsa-miR-128, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-365a-3p und hsa-let-7g-5p [202, 244, 245].

Lindberg *et al.* untersuchten 365 miRNA in Lymphozyten von RRMS-Patienten und gesunden Probanden mittels TaqMan Arrays auf Expressionsunterschiede [244]. Hierbei zeigten sich in den CD4+ T-Zellen von MS-Patienten die Expressionslevel von hsa-miR-193a-5p und hsa-miR-17-5p, letzteres zählt zum miR-17~92 Cluster, erhöht. Auch de Santis *et al.* konnten bei RRMS-Patienten erhöhte Level von miRNA des Clusters miR-17~92 (hsa-miR-19a-3p und hsa-miR-19b-5p) in CD4+ T-Zellen mit Hilfe von Mikroarrays im Vergleich zu Gesunden nachweisen [202]. Des Weiteren waren von der Level miRNA des paralogen Clusters miR-106b~25 (hsa-miR-106b-5p und hsa-miR-25-3p) insbesondere bei den Treg-Zellen von MS-Patienten erhöht [202]. In einer neueren Publikation der Arbeitsgruppe Keller *et al.* wurde außerdem die miRNA hsa-miR-20a-5p des miR-17~92 Clusters als potentieller Biomarker für MS diskutiert, nachdem sie sowohl mittels Next Generation Sequencing und Mikroarrays als in ihrer Expression vermindert beschrieben wurde [245]. Das miR-17~92 Cluster wurde in der Vergangenheit im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten diskutiert [197], wohingegen über die Relevanz von miR-106b~25 bei Autoimmunkrankheiten bisher noch nicht viel bekannt ist. Interessanterweise sind miR-17~92 und miR-106b~25 Paraloge, d.h. sie gehen evolutionsbiologisch aus der Duplizierung desselben Ursprungsgens hervor. Daher sind sie sich in den Sequenzen sehr ähnlich [202].

Neben den Clustern miR-17~92 und miR-106b~25 wurden weitere miRNA im Zusammenhang mit MS beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Paraboschi *et al.* konzentrierte sich auf die Analyse von 22 immunassoziierten miRNA in PBMC von MS-Patienten [246]. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression der miRNA hsa-miR-155-5p. Von Martinelli-Boneschi *et al.* wurden erhöhte hsa-miR-150-5p Level in PBMC von MS-Patienten gefunden [247]. Fenoglio *et al.* fanden hingegen in ihren Untersuchungen von potentiell immunologisch relevanten miRNA bei RRMS-Patienten weder einen Unterschied in der miRNA-Konzentration von hsa-miR-155-5p noch von hsa-miR-150-5p, dafür aber erhöhte Level von hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p und hsa-miR-146b-5p [248]. Waschbisch *et al.* bestätigten mit ihren Untersuchungen bei MS-Patienten die Relevanz von hsa-miR-146a-5p und hsa-miR-155-5p sowie von hsa-miR-326 und hsa-miR-142-

3p, welche in PBMC von RRMS-Patienten erhöhte Expressionslevel zeigten [133]. Außerdem wurden die dysregulierten miRNA hsa-miR-142-3p und hsa-miR-146a-5p unter Glatirameracetat-Therapie herab-reguliert, wohingegen bei mit IFN-beta behandelten Patienten keine Expressionsänderungen dieser miRNA nachgewiesen werden konnten [133].

Da viele neue Studien seit dem Jahr 2010 veröffentlicht wurden, welche bisher noch nicht in der miR2Disease Datenbank zu finden sind, wären die Aufnahme in diese Datenbank sowie weitere Untersuchungen bezüglich der Relevanz dieser neu beschriebenen miRNA bei MS sinnvoll. Die Aktualität muss also bei der Nutzung dieser Datenbank beachtet werden. Dennoch bietet miR2Disease einen guten, schnellen ersten Überblick über Assoziationen von miRNA zu bestimmten Krankheiten. Als Alternative zu miR2Disease könnte die HMDD Datenbank [157] genutzt werden, deren neue Version 2.0 im Juni 2013 veröffentlicht worden ist. Diese Datenbank, die genau wie miR2Disease Informationen zu miRNA in Assoziation zu verschiedenen Krankheiten sammelt, enthält auch neuere Studien und somit derzeit sogar mehr MS-assoziierte miRNA (insgesamt 28 miRNA).

Es wurden sowohl bei den bereits in miR2Disease enthaltenen Studien als auch bei den neueren Studien weitgehend unterschiedliche Ergebnisse in der miRNA-Expression in Verbindung mit MS beschrieben. So zeigten die Untersuchungen von Cox *et al.* [132], Keller *et al.* [129], Du *et al.* [131] und Otaegui *et al.* [130] keine einzige Übereinstimmung in ihren nachgewiesenen, differentiell exprimierten miRNA bei MS-Patienten. Diese Abweichungen könnten aus den Unterschieden im Studienaufbau z.B. bei den Messmethoden (Mikroarray vs. PCR), Datenanalysen, sowie den klinischen und demografischen Merkmalen der Patienten (Krankheitsaktivität und -subtyp, Geschlecht, Alter, deren Therapiestatus) resultieren. Auch das gewählte Probenmaterial (z.B. Keller *et al.*: Vollblut vs. Du *et al.*: T-Zellen) hat großen Einfluss auf die miRNA-Expressionsprofile [249]. In Serum- und Plasmaproben können außerdem frei zirkulierende miRNA gemessen werden, welche durch niedrige Level schwerer zu detektieren sind und bei denen Plasmakomponenten und Hämolyse Einfluss auf die miRNA-Level nehmen können [249]. Dafür können diese Proben sehr gut über längere Zeit bei niedrigen Temperaturen gelagert und später analysiert werden. Bei der Untersuchung von PBMC werden hingegen zellspezifische miRNA-Expressionsprofile untersucht, welche sich von den miRNA Leveln in Serum und Plasma wesentlich unterscheiden können. Dies muss bei dem Vergleich der Studienergebnisse berücksichtigt werden [249].

Insgesamt sind bei all den vorher beschriebenen, einschließlich der bereits in die miR2Disease Datenbank aufgenommenen Studien besonders die Unterschiede in der Expression der miRNA hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-326 und hsa-miR-155-5p wiederholt beschrieben worden. Bei der Literaturrecherche fiel hierbei besonders das redundante Beschreiben der veränderten

Expression von miRNA aus den beiden verwandten Clustern miR-17~92 und miR-106b~25 bei MS-Patienten auf [202, 244, 245]. Vertreter dieser Cluster finden sich auch in der Analyse dieser Arbeit (hsa-miR-17-5p und hsa-miR-20a-5p) wieder (Kapitel 4.1.2). Beide miRNA zeigen in dem dargestellten Netzwerk einen hohen Grad an Interaktionen zu Zielgenen (Abb. 8). Die Relevanz dieser miRNA als potentielle diagnostische, prognostische oder therapeutische Biomarker für die MS gilt es in zukünftigen Studien zu validieren (Kapitel 5.3).

5.2. Diskussion der Analyse der microRNA- und mRNA-Expression unter Interferon-beta-1b-Therapie bei Multiple Sklerose Patienten

In den Untersuchungen zu den miRNA- und mRNA-Expressionsänderungen in den PBMC von 6 Patienten unter einer neu begonnenen IFN-beta-1b-Therapie wurden die Daten zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (Baseline, nach zwei Tagen, 4 Tagen und einem Monat) erhoben. Die Ergebnisse dieser longitudinalen Studie werden nachfolgend diskutiert.

5.2.1. Patientenkohorte

Alle Patienten, die für diese Studie rekrutiert wurden, waren gleicher ethnischer Herkunft (Kaukasier) und weiblichen Geschlechts. Dies waren allerdings keine festgelegten Selektionskriterien für die Studie. Jedem Patienten, der sich innerhalb eines bestimmten Zeitraums in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock mit diagnostiziertem KIS bzw. MS vorstellte und bei dem die Einstellung auf IFN-beta-1b geplant war, wurde die Partizipation an der Studie, unabhängig von Geschlecht, Alter und Herkunft, angeboten. Voraussetzung war jedoch, dass bisher keine immunmodulatorische Therapie oder eine Plasmapherese erfolgte. Es ist bekannt, dass Frauen in etwa dreimal häufiger an der schubförmigen MS erkranken als Männer [5]. Aus diesem Grund wird ein enger Zusammenhang mit dem Auftreten der MS und dem Geschlecht vermutet. Es zeigte sich in verschiedenen Studien, dass Geschlechtshormone Einfluss auf den Verlauf der MS nehmen können, z.B. während und nach einer Schwangerschaft oder im hormonellen Zyklus einer Frau [250, 251]. Diese hormonellen Zyklusschwankungen könnten eventuell auch Einfluss auf die mRNA- oder miRNA-Expression haben und somit die Varianz der Daten verstärkt haben. In früheren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass das Geschlecht scheinbar keinen wesentlichen Einfluss auf die Genexpressionsänderungen unter IFN-beta-1b-Therapie nimmt [76]. Vermutlich trifft das auch auf die miRNA-Expressionsdaten zu, da bei später durchgeführten Validierungsuntersuchungen bei weiteren 12 Patienten durch unsere Arbeitsgruppe keine Unterschiede in den Expressionsänderungen zwischen Frauen und Männern beobachtet werden konnten [192]. Dass alle Patienten gleicher ethnischer Herkunft sind, ist von Vorteil, da sich in der Vergangenheit Unterschiede in der Inzidenz und Prävalenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen oder auch zwischen Personen unterschiedlicher geografischer Herkunft [7, 9] (Kapitel 1.1.1) zeigten und somit auch die Expression von miRNA oder mRNA bei Personen unterschiedliche Herkunft beeinflusst sein könnte.

Allen Patienten wurde das gleiche IFN-beta-1b-Präparat (Betaferon®) verabreicht. Das ist dahingegen relevant, da unterschiedliche Dynamiken in den Expressionsänderungen von mRNA unter den unterschiedlichen Präparaten beschrieben wurden [252]. Auch der EDSS, welcher zu

Studienbeginn bei allen Patienten zwischen 1,0 und 2,5 ($MW \pm SA = 1,7 \pm 0,5$) lag, war relativ gut vergleichbar. Dieser EDSS ist außerdem insofern repräsentativ, da die meisten RRMS-Patienten in der frühen Erkrankungsphase einen EDSS unter Drei aufweisen [56].

Vermutlich konnte durch diese relativ gut vergleichbaren Patientenmerkmale insgesamt eine bessere Vergleichbarkeit der Expressionswerte zwischen den Patienten erreicht werden. Jedoch müssen bei dieser Studie auch einige Punkte kritisch betrachtet werden. Die Altersspanne der Patienten war recht groß, wobei der jüngste Patient erst 22 und der älteste Patient bereits 60 Jahre alt war ($MW \pm SA = 37,5 \pm 14,9$ Jahre). Der Einfluss des Alters eines Patienten auf die erhobenen miRNA-Expressionsdaten unter einer IFN-beta-Therapie ist unbekannt, da bisher keine vergleichbaren Studien zu dieser Thematik vorliegen.

Es muss außerdem beachtet werden, dass sehr kleine Patientenzahlen wenig repräsentativ für große Populationen sind und die Ergebnisse womöglich nur einen Trend aufzeigen. Bei kleinen Patientenkohorten sind statistische Signifikanzen allgemein kritisch zu betrachten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Datenerhebung und -analyse von nur einem Patienten, in der Weise, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, mit einem hohen Kostenaufwand verbunden ist, so dass die auf den ersten Blick geringe Patientenanzahl dennoch respektabel ist. Die Studie wurde in der Intention durchgeführt, einen ersten Überblick von gleichzeitig veränderter miRNA- und mRNA-Expression unter IFN-beta-1b-Therapie zu erhalten und damit die Grundlage für weitere Validierungsexperimente zu schaffen. Diese wurden von unserer Arbeitsgruppe mittlerweile gezielt zu 5 der 20 gefilterten miRNA mit PBMC von weiteren 12 MS-Patienten durchgeführt und publiziert [192]. Dabei konnten die miRNA hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p und hsa-miR-532-5p als unter IFN-beta-1b-Therapie herunterreguliert bestätigt werden.

5.2.2. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten

Insgesamt fiel bei einer ersten Sichtung der erhobenen miRNA-Daten auf, dass bei allen Proben die Daten von *Card B* deutlich niedriger ausgefallen waren als die Daten von *Card A*. Da der Hersteller die beiden Karten so angelegt hat, dass miRNA, bei denen eine relativ hohe Expression zu erwarten ist und bei denen die TaqMan-Assays sehr spezifisch und sensitiv sind, auf *Card A* platziert wurden, war dieses Ergebnis zu erwarten. Des Weiteren zeigte sich bei der Qualitätskontrolle, dass für MS05 für alle 4 Zeitpunkte die Expressionswerte für *Card B* sehr niedrig ausgefallen waren. Da alle Zeitpunkte für sich genommen aber vergleichbar waren, wurden diese Daten unter Vorbehalt verwendet. Da dies nur *Card B* und nicht *Card A* betraf sowie alle 4 PBMC-Proben dieses Patienten, lag vermutlich eine experimentelle Abweichung und kein biologischer Effekt vor. Die Vergleichbarkeit der Daten zwischen den einzelnen Zeitpunkten war akzeptabel. Die Varianz war bei den miRNA-Daten jedoch relativ hoch, besonders für

niedrig exprimierte miRNA. Die Variabilität der mRNA-Daten fiel im Vergleich zu den miRNA-Daten niedriger aus. Es ist zu beachten, dass die Analyse der mRNA-Expression ein schon viel länger etabliertes Verfahren ist als das der miRNA-Analyse und damit vermutlich weniger systematische Fehler auftreten. Außerdem sind miRNA im Allgemeinen sehr niedrig exprimiert, so dass Messungenauigkeiten einen größeren Einfluss nehmen. Auch bei vielen anderen Forschungsgruppen zeigte sich diese Herausforderung, was zum Teil auch die große Diversität zwischen den vielen bereits durchgeführten Studien zu miRNA bei MS-Patienten erklärt (Kapitel 5.1.6). Die Obergrenze des Ct-Werts der miRNA-Daten wurde bewusst auf 38 festgelegt, da hohe Werte weniger vertrauenswürdig sind als niedrige [253].

Auch die Daten zu den parallel durchgeführten mRNA-Messungen der PBMC-Proben wurden auf ihre Qualität hin begutachtet. Problematisch bei der Vorverarbeitung der mRNA-Expressionsdaten stellt sich bekanntermaßen dar, dass die verwendeten Sonden von Affymetrix auf der Genomannotation von 2001 basieren, welche teilweise fehlerhaft war, da man damals zum Teil noch nicht genau wusste, wo bestimmte Gene liegen [254]. Das führt dazu, dass einige Sonden nicht spezifisch sind und somit auch weitere Transkripte außer das gewünschte hier ein Signal auslösen können (Kreuzhybridisierung) bzw., dass einige Sonden nicht sensitiv sind und das gewünschte Transkript hier nicht bindet. Deswegen wurden bei der Auswertung der mRNA-Daten sogenannte Chip Definition Files (CDF) verwendet, mit deren Hilfe auf Basis der aktuellsten Genomannotation ermittelt werden konnte, welche Sonden 100% spezifisch und sensitiv waren [254].

Die gewählte Loess-Methode stellt ein gängiges und geeignetes Verfahren dar, welches den Vorteil bietet, dass die Normalisierung nicht von einzelnen Assays abhängig gemacht wird, sondern es sich hierbei um eine globale, nicht-lineare Normalisierungsmethode handelt [184].

5.2.3. Expressionsänderungen von microRNA und mRNA unter Interferon-beta-1b-Therapie

Zu allen Zeitpunkten unter der IFN-beta-Therapie zeigte sich bei der Auswertung der gemessenen Expressionswerten, dass mehr miRNA herunter- als hochreguliert wurden. Diese Veränderungen unter der Therapie sind in Tab. 12 (Kapitel 4.2.3) dargestellt. Dabei zeigten sich die stärksten Veränderungen einem Monat nach Therapiebeginn, was mit der einschleichenden Steigerung der IFN-beta-1b-Dosis innerhalb der ersten drei Therapiewochen zu begründen ist. Diese vorliegende Studie ist die erste, welche sich explizit mit miRNA-Expressionsänderungen unter IFN-beta-1b-Therapie befasste. Womöglich handelt es sich bei den 20 gefilterten miRNA um miRNA, die nur unter Therapie Veränderungen in ihrer Expression zeigen, aber bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nicht als verändert exprimiert auffallen. Weitere

longitudinale Studien zu miRNA-Expressionsänderungen unter immunmodulatorischen MS-Therapien, besonders mit größeren Patientenpopulationen, sind erforderlich.

Bisher existieren nur zwei vergleichbare Querschnittstudien zu miRNA-Expressionsänderungen unter einer immunmodulatorischen Therapie. Die erste befasste sich mit dem Einfluss von Glatirameracetat und Interferon-beta (nicht Präparat-spezifisch) auf ausgewählte immun-spezifische miRNA (Kapitel 5.1.6). Diese Studie von Waschbisch *et al.* (2011) untersuchte allerdings die Expression von nur 5 miRNA zu einem Zeitpunkt nach Therapiebeginn und nicht, wie bei der hier vorgestellten Studie, das miRNA-Expressionsprofil von hunderten von miRNA bei RRMS-Patienten unter Präparat-spezifischer Therapie in einer Zeitreihe [133]. Zusätzlich wurde in der hier vorgelegten Arbeit parallel auch das mRNA-Expressionsprofil der Patienten bestimmt. Eine andere Studie von Sievers *et al.* untersuchte die miRNA-Expressionsunterschiede in B Lymphozyten unter einer Natalizumab-Therapie [255]. Dabei wurden die Proben von je 10 Gesunden, 10 unbehandelten sowie 10 mit Natalizumab-behandelten RRMS Patienten miteinander verglichen, aber nicht im Zeitverlauf betrachtet [255].

Die in der hier präsentierten Arbeit differentiell exprimierten miRNA unter Interferon-beta-1b-Therapie (Tab. 12) zeigten keine Überlappungen zu den in Kapitel 4.1.2 (Tab. 5) präsentierten 16 MS-assoziierten miRNA. Dennoch wurden einige dieser 20 miRNA bereits in neueren Studien im Zusammenhang mit MS diskutiert. Zum Beispiel zeigten hsa-let-7a-5p und hsa-let-7b-5p erhöhte Expressionslevel unter IFN-beta-Therapie. Diese beiden miRNA zählen zur let-7-Familie und weisen im Netzwerk gemeinsame Zielgene auf (Abb. 14). Es wurde bereits beobachtet, dass die Expression von hsa-let-7b-5p in Makrophagen durch IFN-beta induziert wird, wobei scheinbar negative Rückkopplungsschleifen existieren, da hsa-let-7b-5p seinerseits endogene IFN-beta-Transkripte posttranskriptionell reprimieren kann [256]. Des Weiteren scheinen miRNA der let-7-Familie die Expression von IL10 in CD4+ T-Zellen zu modulieren, wobei erniedrigte miRNA-Level mit erhöhten Leveln an IL10 einhergehen [257]. In einer anderen Studie zeigte sich hsa-let-7a-5p im Blutplasma von SPMS-, allerdings nicht von RRMS-Patienten, verändert [258]. Im Tiermodell der EAE konnten erhöhte Expressionslevel der let-7-Familie in Lymphknoten nachgewiesen werden [259]. Die let-7-Familie scheint zudem nicht nur eine Rolle bei der T-Zelldifferenzierung [260] zu spielen, sondern auch bei der Neurodegeneration im ZNS [261]. Eine andere unter Therapie differentiell exprimierte miRNA war hsa-miR-16-5p. Sie gehörte mit 10 Kanten zu den miRNA mit den meisten Interaktionen im Netzwerk (Abb. 14). Die miRNA hsa-miR-16-5p trägt zur Differenzierung naiver CD8+ T-Zellen bei [262] und scheint in Monozyten indirekt über NFkappaB die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL8 zu fördern [127]. Des Weiteren zeigte diese miRNA auch in einer anderen Studie Expressionsänderungen bei MS-Patienten, wobei erniedrigte Level von hsa-miR-16-5p in CD4+ T-Zellen von RRMS-Patienten nachgewiesen wurden [263]. Es gab noch weitere miRNA, welche einen Monat nach IFN-beta-1b-Therapiebeginn Expressionsänderungen zeigten, z.B. hsa-miR-

29a-3p und hsa-miR-29c-3p. Diese beiden miRNA liegen im Netzwerk (Abb. 14) nah beieinander, da sie viele gemeinsame Zielgene aufweisen. Da beide miRNA aus der mir-29-Familie stammen und sich in nur einem Nukleotid in der Sequenz unterscheiden, war dies zu erwarten. In späteren Untersuchungen mit weiteren 12 MS-Patienten unter IFN-beta-1b Therapie, konnten diese beiden miRNA als unter Therapie niedriger exprimiert validiert werden [192]. In einer Studie von Sondergaard *et al.* wurden erniedrigte Level von hsa-miR-29a-3p in PBMC von Therapie-naiven RRMS-Patienten detektiert [264]. Außerdem scheint der NFkappaB-Signalweg inhibitorisch auf die Expression der mir-29-Familie zu wirken [265]. NFkappaB wurde bereits in Kapitel 5.1.3 im Zusammenhang mit MS diskutiert und ist auch Teil des Apoptoseweges in Zellen.

Neben den miRNA-Expressionsänderungen wurden die Top 10 der im Durchschnitt am stärksten exprimierten miRNA bestimmt (Tab. 11). Hierbei zeigten sich einige interessante Übereinstimmungen zu den Arbeiten anderer Forschungsgruppen und u.a. auch zu den im Kapitel 4.1.2 präsentierten MS-assoziierten miRNA. Die bei den MS-Patienten durchschnittlich am höchsten exprimierte miRNA war hsa-miR-223-3p. Sie ist dafür bekannt, an der Granulopoese teilzuhaben [124] und wurde in den PBMC von MS-Patienten als erhöht exprimiert beschrieben [129, 266]. Daneben zeigte diese miRNA in der durchgeführten Expressionsanalyse von MS-assoziierten miRNA mit Hilfe der Daten von Landgraf *et al.* [118] eine erhöhte Expression in dendritischen Zellen, Granulozyten, aber auch in Monozyten (Abb. 9). Zwei weitere miRNA (hsa-miR-17-5p und hsa-miR-19b-5p) waren ebenfalls sehr hoch exprimiert und gehören beide dem miR-17~92 Cluster an. Dieses Cluster wurde in der Literatur als an der T-Zelldifferenzierung sowie an der B-Zellproliferation und Monozytopoese beteiligt beschrieben [120, 123, 125]. De Santis *et al.* fanden in den Untersuchungen von Treg-Zellen von RRMS-Patienten erhöhte hsa-miR-19b-5p Level [202]. Des Weiteren beschrieben Lindberg *et al.* eine erhöhte Expression von hsa-miR-17-5p in CD4+ T-Zellen von MS-Patienten [244]. Im Jahr 2012 untersuchten Sievers *et al.* miRNA in den B Lymphozyten von unbehandelten und Natalizumab-behandelten RRMS-Patienten sowie von gesunden Probanden. Dabei zeigten sich miRNA des Clusters miR-17~92 und miR-106b-25 sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten RRMS Patienten im Vergleich zu Gesunden in ihrer Expression verändert [255].

Auf Platz 10 von Tab. 11 befindet sich hsa-miR-106a-5p, die dem Cluster miR-106a~363 angehört, welches paralog zu dem Cluster miR-17~92 ist. Dieses Cluster wurde sowohl von Otaegui *et al.* als auch von Keller *et al.* (Kapitel 4.1.1) mit MS in Verbindung gebracht [129, 130]. Eine Beteiligung der beiden Cluster miR-17~92 und miR-106a~363 an dem Krankheitsgeschehen der MS ist, bei der auffallend redundanten Beschreibung veränderter Expressionslevel bei MS-Patienten in der Literatur, wahrscheinlich.

Parallel zu den miRNA-Expressionsmessungen wurden Messungen zu den mRNA-Expressionsänderungen unter Therapie vorgenommen. Auch hier waren die stärksten Veränderungen nach einem Monat zu beobachten. Dass die stärksten Expressionsänderungen erst nach einem Monat auftraten, kann, wie bei den miRNA-Daten, mit der Verwendung des Betaferon®-*Titrationspacks* begründet werden. Da die Enddosis von IFN-beta-1b erst nach drei Wochen verabreicht wurde, könnten die biologische Effekte der Therapie und damit eventuell die Expressionsänderungen der mRNA bzw. miRNA mit beeinflusst worden sein.

Die mRNA-Level von 4 Genen (FCER1A, IFI6, IFI44L und SIGLEC1) zeigten sich zu allen Zeitpunktvergleichen verändert. Daneben existierten 5 Gene (IFI44, RSAD2, IFIT1, IFI27 und MX1), die sowohl 4 Tage nach Therapiebeginn als auch nach einem Monat erhöht exprimiert vorlagen. Mehrere Studien zeigten ähnliche Expressionsänderungen unter IFN-beta-Therapie, welche im Folgenden kurz dargestellt werden. Die Gruppe um van Baarsen *et al.* untersuchte mRNA-Expressionsprofile in PBMC von RRMS-Patienten vor sowie unter IFN-beta-Therapie. Einen Monat nach Therapiebeginn zeigten sich die Expressionslevel besonders von IFI27, aber auch von RSAD2, IFIT1, MX1 sowie IFI44L erhöht [74], was konkordant zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist. Auch Sellebjerg *et al.* untersuchten mittels Affymetrix-Mikroarrays den Einfluss einer IFN-beta-Therapie auf die mRNA-Expressionsprofile von MS-Patienten. Innerhalb von 12 Stunden nach IFN-beta-Injektion konnten sie erhöhte Level von IFI6, CXCL10, IFI27 sowie IFIT1 detektieren [75]. Goertsches *et al.* führten eine, im Vergleich zu der hier dargestellten Studie, sehr ähnliche Untersuchung mit PBMC von 25 MS-Patienten unter IFN-beta-1b-Therapie durch. Hierbei zeigte sich neben einer Induktion von RSAD2, IFI44, IFI44L und IFIT1 auch eine Repression von FCER1A über alle Zeitpunkte [76]. Diese Veränderungen konnten auch in der hier durchgeführten Studie (Tab. 13) beobachtet werden. Des Weiteren beschrieben Hundeshagen *et al.* (2012) [77] erhöhte MX1, IFIT1, IFI27, RSAD2 und STAT1 Level in PBMC von RRMS-Patienten innerhalb eines Monats nach Therapiebeginn mit IFN-beta. Auch diese Ergebnisse stehen analog zu den Beobachtungen, welche in der vorgelegten Arbeit gemacht wurden (Tab. 13).

Geringe Unterschiede in den Studien zu den Genexpressionsänderungen unter IFN-beta-Therapie könnten u.a. an unterschiedlichen Studiendesigns (Patientenauswahl, Probenart, IFN-beta-Präparat, Messzeitpunkte) und unterschiedlichen Messtechniken liegen. Nichtsdestotrotz konnten viele Übereinstimmungen zu Expressionsänderungen von mRNA unter IFN-beta-1b-Therapie zu den Ergebnissen anderer Studien gesehen werden. Die Funktionen dieser differentiell exprimierten Gene wurden bereits diskutiert [267, 268] und sind nicht zentraler Gegenstand dieser Arbeit.

5.2.4 Interaktionen und ausgewählte Zielgene der differentiell exprimierte microRNA unter Interferon-beta-1b-Therapie

Die 20 gefilterten miRNA und die 95 gefilterten mRNA wurden mit Hilfe von miRWalk und miRTarBase auf potentielle Interaktionen untersucht und mit Hilfe von Cytoscape in einem Netzwerk visualisiert (Abb. 14). Die miRNA mit den meisten Interaktionen im Netzwerk waren hsa-miR-16-5p und hsa-miR-532-5p, die zu jeweils 9 IFN-beta-responsiven Zielgenen Kanten zeigten (Abb. 14). Dies legt nahe, dass beide miRNA auf molekularer Ebene eine zentrale Rolle bei der IFN-beta-Therapie spielen könnten. Besonders interessant war dabei, dass die herunterregulierte hsa-miR-532-5p mit insgesamt 7 hochregulierten Zielgenen verbunden war, was ein Hinweis auf deren direkte posttranskriptionelle Regulation ist. Die veränderte Expression von hsa-miR-532-5p konnte in späteren Messungen bei weiteren 12 MS-Patienten unter IFN-beta-1b-Therapie validiert werden [192].

Im Netzwerk wurden miRNA mit vielen gemeinsamen Zielgenen in räumlicher Nähe angeordnet. Hier fielen u.a. die miRNA hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29c-3p mit übereinstimmenden Zielgenen (z.B. SESN1, AHR, CXCL10 und EPSTI1), aber auch hsa-let-7a-5p und hsa-let-7b-5p, mit den gemeinsamen Zielgenen TNFSF10, IL8, XAF1 und SAMD9L auf. Diese 4 miRNA wurden bereits im Kapitel 5.2.3 diskutiert.

Die im Netzwerk visualisierten Zielgene wurden ebenso auf Verbindungen zu MS bzw. zu Interferon-beta überprüft, wobei hier insbesondere die Gene MX1, STAT1 und RSDA2 auffielen. Das Gen MX1 kodiert das Protein MxA, welches der endogenen Virusabwehr dient [269] und im Netzwerk mit der hochregulierten hsa-miR-760 verbunden ist (Abb. 14). MxA ist dafür bekannt, dass es die Bioaktivität von IFN-beta widerspiegeln kann [80]. Bei einigen Patienten kommt es unter Therapie jedoch zur Bildung von NAK, welche u.a. zu einem fehlenden Anstieg der Expressionslevel von MX1 führen [80]. Das im Netzwerk hochregulierte STAT1, welches mit der herunterregulierten hsa-miR-532-5p assoziiert ist, wird u.a. durch Typ I Interferone über den JAK-STAT-Signalweg aktiviert und zu pSTAT1 phosphoryliert, um als Komplex mit anderen TF in der Promotorregion von Typ I IFN-responsiven Genen deren Expression zu fördern [270]. Zusätzlich kann auch das unphosphorylierte STAT1 als TF an einige dieser Gene (u.a. STAT1 und MX1) binden und die Wirkung von pSTAT1 verlängern [271]. Die unter Therapie erhöhten STAT1-Level erhöhen damit die Expression von IFN-responsiven Genen im Sinne einer Rückkopplungsschleife. Es ist beschrieben, dass STAT1 eine Rolle bei der Apoptose [272] sowie in der TH1-Zelldifferenzierung [273] einnimmt. Außerdem wurde die Hemmung von STAT1 durch hsa-miR-145-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-222-3p beschrieben [274]. Ein weiteres hochreguliertes Gen im Netzwerk ist das durch Typ I IFN induzierbare RSDA2, welches bei der endogenen Virusabwehr [275] und bei der TH2-Zelldifferenzierung [276] partizipiert. Interessanterweise besitzt RSDA2 in seiner Promotorregion eine Bindestelle

für STAT1 [77]. RSAD2 weist in Abb. 14 eine Interaktion mit der hochregulierten miRNA hsa-miR-760 und mit der herunterregulierten hsa-miR-532-5p auf. Dieses Beispiel zeigt die Komplexität von miRNA-Netzwerken: Ein Gen kann theoretisch durch mehrere miRNA reguliert werden und der Nettoeffekt ist deswegen oft schwer abzuschätzen (Kapitel 5.1.4).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese IFN-responsiven Gene potentiell einer posttranskriptionellen Regulation durch miRNA unterliegen, wobei diese miRNA selbst in ihrer Expression durch die IFN-beta-Therapie beeinflusst werden können. Der maßgebliche Regulationsweg der IFN-responsiven Gene wird vermutlich über die bekannten Interaktionen mit regulierenden TF stattfinden und miRNA tragen nur zu einem gewissen Anteil, z.B. im Sinne einer Feinregulation, zu den Expressionsänderungen unter Therapie, bei. Der genaue Beitrag ist bisher schwer abschätzbar. Weitergehende Studien wären wünschenswert, um den Anteil der miRNA an der Regulation besser einschätzen zu können. Des Weiteren sollte insbesondere der Einfluss der Expressionsänderungen von hsa-miR-532-5p und hsa-miR-16-5p unter IFN-beta-Therapie auf die Expression von gefilterten Zielgenen, wie STAT1 oder RSAD2, in zukünftigen Untersuchungen näher betrachtet werden. Diese miRNA zeigten in Abbildung 13 besonders viele Interaktionen. Es könnten z.B. gezielte *in vitro* Untersuchungen an PBMC mit Hilfe von synthetisch hergestellten miRNA und miRNA-hemmenden „anti-miRNA“ durchgeführt werden, wobei der Einfluss der miRNA-Level auf die Expression bestimmter Gene gemessen wird. Auf ähnliche Weise wurden in früheren Studien bereits miRNA-mRNA-Interaktionen bestimmt [127].

5.3. MicroRNA als potentielle Biomarker bei Multipler Sklerose

Da MS eine äußerst heterogene Erkrankung ist, deren Verlauf individuell schwer zu prognostizieren ist, wäre der Einsatz von verlässlichen Biomarkern zur Verbesserung der Diagnose, Therapie- und Verlaufsbeobachtung der Patienten wünschenswert. Bisher existieren nur solitäre klinisch etablierte Biomarker für MS, wie der Nachweis von oligoklonalen Banden [65] in Rahmen der Diagnosesicherung, der Nachweis von NAK unter IFN-beta-Therapie [82] oder der Nachweis von Aquaporin-4-Antikörpern zur Differenzierung einer NMO [82]. Der Einsatz von miRNA als potentielle Biomarker wurde schon im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, u.a. Krebs oder rheumatologischen Krankheitsbildern diskutiert [91]. Im Allgemeinen können miRNA mit relativ einfachen Methoden im peripheren Blut gemessen werden und Expressionsveränderungen im Blut scheinen mit bestimmten Krankheiten assoziiert zu sein. Insgesamt gibt es erst wenige Studien zur spezifischen Fragestellung von miRNA als MS-Biomarker, weswegen sich bei MS bisher noch keine miRNA als Biomarker im klinischen Alltag etablieren konnte.

Es existieren bereits einige Studien zur Expressionsanalyse von miRNA bei MS-Patienten, jedoch herrscht eine relativ große Diversität in den Ergebnissen. Es gibt jedoch miRNA, die u.a. als diagnostische Biomarker in Frage kommen könnten, da sie in der Literatur gehäuft in Assoziation mit MS diskutiert wurden. Dazu zählen z.B. die paralogen Cluster miR-106b~25, miR-106a~363 und miR-17~92, deren zugehörige miRNA u.a. in Studien von Otaegui *et al.* [130], Keller *et al.* [129], Cox *et al.* [132], de Santis *et al.* [202], Lindberg *et al.* [244] und Sievers *et al.* [255] als verändert exprimiert nachgewiesen wurden. miRNA der Cluster miR-17~92 (hsa-miR-17-5p und hsa-miR-19b-5p) und miR-106a~363 (hsa-miR-106a-5p) gehörten zu den am höchsten exprimierten miRNA bei den 6 untersuchten MS-Patienten der in dieser Arbeit dargelegten Studie. Neben diesen, zeigten sich bei einigen anderen hoch exprimierten miRNA Redundanzen in der Literatur. So wurden die miRNA hsa-miR-223-3p [129, 266], hsa-miR-146a-5p [133, 248] bzw. hsa-miR-150-5p [247] wiederholt als bei MS-Patienten differentiell exprimiert beschrieben. Die Durchführung weiterer Studien zur Evaluierung dieser miRNA als potentielle Biomarker z.B. in der Diagnostik bei MS wäre wünschenswert. Die Studie von Keller *et al.*, überprüfte explizit den potentiellen Einsatz von miRNA als diagnostische Biomarker unter der Verwendung vorselektierter miRNA. Dabei ließen sich MS-Patienten von gesunden Kontrollen mit einer Sensitivität von ca. 98 Prozent und einer Spezifität von etwa 96 Prozent trennen [129]. Dies unterstützt die Annahme, dass miRNA eventuell als diagnostische Biomarker im Blut, Serum, Liquors, etc. bei MS in Betracht kommen könnten. Eine unabhängige Validierung dieses Ergebnisses ist jedoch noch nötig.

Außerdem sind miRNA potentielle Kandidaten für den Einsatz als therapeutische Biomarker. Sie könnten unter Umständen die biologischen Effekte und im Idealfall als Surrogate die klinische

Wirksamkeit einer Therapie widerspiegeln (Kapitel 1.2.1). Waschbisch *et al.* (2011) [133] untersuchten neben Expressionsunterschieden von miRNA bei MS-Patienten zu gesunden Probanden auch den Einfluss von krankheitsmodulierenden Therapien auf die Expression von 5 ausgewählten miRNA bei MS-Patienten. Dabei wurde unter Glatirameracetat-Therapie eine herunterregulierte Expression von hsa-miR-142-3p und hsa-miR-146a-5p beobachtet, was ein Hinweis für den möglicherweise korrigierenden Einfluss der Therapie auf dysregulierte miRNA ist. Solche Studien sind äußerst wichtig, um feststellen zu können, ob eine Therapie Einfluss auf dysregulierte miRNA nimmt und ob sich miRNA als therapeutische Biomarker für eine Therapie eignen könnten. Bisher existierten noch keine Studien, welche explizit den Einfluss von IFN-beta auf die globale miRNA-Expression bei MS-Patienten im Blut untersucht haben. Dahingegen ist bereits viel über die mRNA-Veränderungen unter dieser Therapie bekannt [252] (Kapitel 5.2.3). Unter diesen Gesichtspunkten wurde die in dieser Arbeit dargestellte Studie zu den globalen miRNA- und mRNA-Expressionsänderungen unter IFN-beta-Therapie mit dem Ziel durchgeführt, ob sich einige der miRNA-Kandidaten als therapeutische Biomarker eignen. Einige der 20 gefilterten miRNA wurden erstmalig im Zusammenhang mit MS beschrieben. Hingegen wurden andere miRNA, wie die aus der let-7- oder mir-29-Familie, bereits in früheren Studien im Zusammenhang mit MS diskutiert [258, 264]. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe bei späteren Messungen in einer weiteren, größeren Patientenkohorte die miRNA hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p und hsa-miR-532-5p als unter Therapie differentiell exprimiert validieren [192]. Insbesondere diese validierten miRNA könnten biologische Effekte der IFN-beta-1b-Therapie auf miRNA-Ebene widerspiegeln und somit potentiell als therapeutische Biomarker in Frage kommen. Mit MX1 existiert bereits ein wichtiger therapeutischer Biomarker der IFN-beta-Therapie, welcher Hinweise auf das Vorhandensein von NAK geben kann [80]. In ähnlicher Weise könnte auch eine fehlende Expressionsänderung einer der 20 miRNA ein Hinweis auf NAK sein. Dies könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, indem z.B. die miRNA-Expression zwischen NAK-positiven und NAK-negativen Patienten verglichen wird. Weiterer Gegenstand solcher Studien könnte auch sein, miRNA hinsichtlich ihres Potentials als Surrogatmarker für die klinische Wirksamkeit einer IFN-beta-Therapie zu prüfen. Genauso interessant wäre die Frage, ob eine der 20 miRNA als prädiktive Biomarker für den Erfolg der IFN-beta-Therapie fungieren könnte. So könnte in größeren Patientenkohorten evaluiert werden, ob der Zeitpunkt und die Stärke einer frühzeitigen miRNA-Expressionsänderung mit dem langfristigen Therapieerfolg korrelieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zukünftige Studien wichtig wären um zu klären, ob sich miRNA als klinische Biomarker, z.B. als *Screening*-Marker, diagnostische Marker, *Staging*-Marker oder prognostische Marker, eignen. Außerdem sollte der Einfluss von weiteren Therapien (z.B. Natalizumab, Glukokortikoiden, Mitoxantron oder Fingolimod) oder der Einfluss von unterschiedlichen IFN-beta-Präparaten (IFN-beta-1b s.c. vs. IFN-beta-1a s.c. bzw. i.m.) auf

die miRNA-Expression und das Potential der miRNA als therapeutische Biomarker im Allgemeinen in Zukunft näher betrachtet werden. Dies sollte dazu beitragen, ein besseres Verständnis für die immunologischen Prozesse der MS und für die Wirkmechanismen der immunmodulatorischen Therapien zu entwickeln. Auf diese Weise könnten miRNA helfen, die Diagnose, Verlaufsbeobachtung und Behandlung der MS zu verbessern und eventuell auch neue Therapien zu entwickeln, die gezielt miRNA und die biologischen Prozesse, welche sie regulieren, als Ziel haben. Außerdem wäre es möglich miRNA in Zukunft als prognostische Biomarker bei MS einzusetzen, um z.B. den individuellen Krankheitsverlauf frühzeitig einzuschätzen und somit die Therapieentscheidung für eine individualisierte Therapie gezielter treffen zu können. Die Relevanz der individualisierten Therapie bekommt immer mehr Bedeutung in der Klinik und wird noch mehr zunehmen, je mehr neue Therapien für MS zugelassen werden, da das klassische Basis-Eskalations Therapie-Konzept zunehmend verlassen wird [62].

Obwohl in diesem Bereich schon intensiv Forschung betrieben wird, ist man noch relativ am Anfang um einschätzen zu können, welche biologische Signifikanz und welches therapeutische Potential in miRNA steckt. Erste Aspekte zur Bedeutung der miRNA bei neuroimmunologischen Prozessen im ZNS, wurden mit der vorliegenden Arbeit erreicht und bereits von der Arbeitsgruppe publiziert [190, 192].

6. Zusammenfassung

Hintergründe: In der vorliegenden Arbeit werden miRNA im Kontext der MS untersucht. Zunächst wird im Literatur-basierten Teil dieser Arbeit ein Überblick über die verschiedenen, existierenden Datenbanken mit ihren vielfältigen Informationen zum Thema miRNA vermittelt. Es existiert eine große Vielzahl verschiedener Datenbanken mit einer hohen Variabilität in Qualität und Quantität an Informationen zu miRNA. Gerade für Einsteiger stellt es sich als große Herausforderung dar sich einen schnellen Überblick über die Menge an Datenbanken und deren enthaltene Informationen zu verschaffen sowie diese Informationen sinnvoll zu verwenden. Bei dem experimentellen Teil dieser Arbeit wird der Einfluss einer IFN-beta-1b Therapie auf die Expressionsmuster von miRNA und mRNA in Blutzellen von MS-Patienten geprüft. Dies ist weltweit die erste Studie, welche bei MS-Patienten parallel die Expressionsänderungen von miRNA und mRNA in der frühen Phase einer IFN-beta-Therapie erfasste. Bisher gab es erst wenig Kenntnisse dazu, welchen Einfluss immunmodulatorische Therapien auf die miRNA-Expression bei MS-Patienten haben sowie wie das Potential von miRNA als diagnostische, therapeutische oder prognostische Biomarker einzuschätzen ist.

Ziele: Das Hauptziel dieser Arbeit war, die Rolle der miRNA in der molekularen Pathophysiologie und deren Einfluss auf die MS besser zu verstehen. Zum einen sollte in dem Literatur-basierten Teil gezeigt werden, wie Informationen aus miRNA-Datenbanken sinnvoll genutzt werden können, um bestimmte Fragestellungen zu MS-assoziierten miRNA zu beleuchten. Dabei sollte insbesondere diesen Fragen nachgegangen werden: Welche allgemeinen Charakteristika weisen MS-assoziierte miRNA auf? Welche potentiellen Zielgene regulieren sie und welche molekulare Funktion nehmen diese Zielgene in Zellen und Signalwegen insbesondere in Bezug auf MS ein? Durch welche TF werden die miRNA selbst reguliert und existiert eine Verbindung zu MS-assoziierten TF? Existieren Rückkopplungsschleifen zwischen den miRNA, Zielgenen und TF? Wie sehen die miRNA-Expressionsprofile in verschiedenen Blutzelltypen und Hirngewebe aus?

Dahingegen sollte die longitudinale Studie dieser Arbeit helfen, neue Erkenntnisse über miRNA im Zusammenhang mit MS und einer IFN-beta-Therapie zu erhalten und die molekularen Mechanismen dieser Therapie besser zu verstehen. Dabei wurden folgende Fragen gestellt: Welche miRNA und mRNA zeigen parallel Expressionsänderungen unter einer Interferon-beta-1b-Therapie bei MS-Patienten? Welche Art der Expressionsänderung (Hoch- vs. Herunter-Regulation) findet dabei statt? Gibt es zwischen den verändert exprimierten miRNA und mRNA Interaktionen? Welche mRNA werden bekanntermaßen von Interferon-beta in der Expression beeinflusst? Wann treten die stärksten Expressionsveränderungen bei miRNA und mRNA auf? Welche miRNA sind bei den MS-Patienten vor der Therapie am höchsten exprimiert?

Die zentrale gemeinsame Zielstellung beider Teile dieser Doktorarbeit war zu überprüfen, inwiefern sich miRNA als diagnostische oder therapeutische Biomarker bei MS eignen.

Methoden: Für die Literatur-basierte Analyse wurden insgesamt 16 bereits in der Literatur beschriebene miRNA aus der miR2Disease-Datenbank entnommen und mit miRBase auf allgemeine Informationen, mit miRWalk und miRTarBase auf potentielle Zielgene, mit miRGen 2.0 auf sie potentiell regulierende TF und mit smirnaDB auf ihre Expressionsprofile in verschiedenen Zelltypen und Geweben geprüft. Des Weiteren erfolgte eine funktionelle Charakterisierung der miRNA in Hinblick auf die molekularen Funktionen und Signalwege ihrer Zielgene mittels der KEGG- und GO *terms*-Datenbanken. Für die longitudinale Studie wurde die mRNA- und miRNA-Expression von 6 weiblichen Patienten in PBMC zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (Baseline, nach zwei Tagen, nach 4 Tagen und nach einem Monat) parallel mittels TaqMan-Arrays und Affymetrix-Mikroarrays gemessen. Die Daten wurden anschließend normalisiert und auf differentiell exprimierte miRNA und mRNA gefiltert. Dabei wurden die jeweiligen Expressionslevel unter Therapie mit denen vor der Therapie (Baseline) verglichen.

Ergebnisse: Bei der Analyse der allgemeinen Charakteristika der 16 MS-assoziierten miRNA fiel auf, dass 4 MS-assoziierte miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p) den paralogen Clustern miR-17~92 bzw. miR-106a~363 zugehörig sind, welche schon in mehreren Studien im Zusammenhang mit dem Immunsystem und MS diskutiert werden. Bei der Überprüfung der miRNA-mRNA-Interaktionen aus miRWalk und miRTarBase, zeigte sich, dass die beiden aus diesen Clustern stammenden miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p die meisten Interaktionen (525 bzw. 513) zu potentiellen Zielgenen aufwiesen. Sie scheinen somit eine besondere Relevanz bei MS zu haben. Des Weiteren wurden bei einigen vorhergesagten Zielgenen (z.B. CDKN1A, PTEN und STAT3) Assoziationen zu MS bzw. dem Immunsystem in der Literatur beschrieben. Viele Zielgene besitzen eine TF-Aktivität und nehmen z.B. an dem MS-assoziierten MAPK- oder TGFbeta-Signalweg teil. Außerdem werden einige der 16 MS-assoziierten miRNA durch immunologisch-relevante TF, wie API1, OCT-1 und NFkappaB, reguliert. Dies spiegelt die Komplexität von miRNA-Netzwerken und ihren Rückkopplungsschleifen wider. Bei der Analyse der miRNA-Expression in Blut- und Hirnzellen zeigte hsa-miR-142-3p hohe Expressionslevel in verschiedenen Blutzellen wohingegen hsa-miR-223-3p besonders in dendritischen Zellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert wird. Diese beiden miRNA scheinen bei der Bildung und Entwicklung der jeweiligen Zelltypen beizutragen. Des Weiteren zeigten die paralogen miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-17-5p erwartungsgemäß ähnliche Expressionsmuster in CD4+ T-Zellen und Monozyten. Mit Hilfe der integrativen Analyse der Informationen aus verschiedenen Datenbanken konnten viele potentielle Zusammenhänge zu MS aufgedeckt werden und es konnte ein Überblick darüber gegeben werden, wie die Informationen aus den vielen, unterschiedlichen miRNA-Datenbanken sinnvoll

genutzt werden können. Diese Erkenntnisse konnten als Grundlage für die Untersuchungen des zweiten Teils der Arbeit genutzt werden.

Im experimentellen Teil der Arbeit konnten insgesamt 20 miRNA und 95 mRNA als unter Therapie verändert exprimiert detektiert werden, wobei bei beiden Datensätzen die stärksten Änderungen einen Monat nach Therapiebeginn zu verzeichnen waren. Dabei zeigten bei den mRNA-Daten 4 Gene (FCER1A, IFI6, IFI44L und SIGLEC1) zu allen Zeitpunkten unter IFN-beta-1b-Therapie eine veränderte Expression, wobei von diesen nur FCER1A reprimiert war. Viele der 95 Gene werden bekannterweise durch Typ I Interferone reguliert oder werden bereits im Zusammenhang mit MS diskutiert. Insgesamt überwog zu allen Zeitpunkten der Anteil der hochregulierten Gene. Von den 20 differentiell exprimierten miRNA waren zwei miRNA (hsa-miR-149-5p und hsa-miR-708-5p) sowohl 4 Tage als auch einen Monat nach Therapiebeginn in ihrer Expression herunterreguliert. Bei den miRNA-Daten überwog der Anteil an niedriger exprimierten miRNA zu allen Zeitpunkten. Einige der 20 miRNA (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-16-5p hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29c-3p) werden bereits im Zusammenhang mit MS bzw. dem Immunsystem diskutiert. Unter den durchschnittlich am höchsten exprimierten miRNA, die aus den Daten aller 6 Patienten ermittelt wurden, waren einige miRNA (u.a. hsa-miR-17-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-150-5p und hsa-miR-223-3p), die bereits in verschiedenen Studien als bei MS-Patienten in ihrer Expression verändert beschrieben werden. Für 34 der 95 gefilterten Gene konnten mit Hilfe von miRWalk und miRTarBase zu 15 der 20 gefilterten miRNA potentielle Interaktionen aufgedeckt werden. Darunter gab es Interaktionen zu typischen Typ I IFN-regulierten Genen (z.B. MX1, STAT1 und RSAD2), was suggeriert, dass diese nicht nur über bereits bekannte IFN-beta-abhängige Signalwege in ihrer Expression beeinflusst werden, sondern zusätzlich posttranskriptionell durch miRNA. Dies legt nahe, dass miRNA über komplexe Regulationsmechanismen die IFN-beta-responsiven Gene beeinflussen und dadurch zur molekularen Wirkweise der IFN-beta-Therapie beitragen. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die IFN-beta-1b-Therapie nicht nur Einfluss auf die Expressionslevel von IFN-beta-responsiven Genen, sondern auch auf die Expression von miRNA in PBMC von MS-Patienten, nimmt. Das Potential der 20 gefilterten miRNA als Biomarker für die biologische Wirkung der IFN-beta-Therapie sollte in zukünftigen Studien näher untersucht und gezielt überprüft werden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass in der Vergangenheit viele verschiedene miRNA bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden als verändert exprimiert beschrieben worden sind. Jedoch existieren nur sehr wenige miRNA, die von verschiedenen Arbeitsgruppen übereinstimmend nachgewiesen wurden und somit als diagnostische Biomarker in Betracht gezogen werden können. Gezielte Untersuchungen zu diesen miRNA (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-223-3p sowie miRNA der Cluster miR-17~92, miR-106a~363 und miR-106b~25) bezüglich auf ihr Potential als diagnostische oder prognostische Biomarker wären

zukünftig wünschenswert. Zudem existieren bisher nur wenige Studien zu miRNA-Expressionsänderungen unter immunmodulatorischen Therapien. In der hier präsentierten longitudinalen Studie konnten 20 miRNA als potentielle therapeutisch Biomarker einer Interferon-beta-1b-Therapie identifiziert werden. In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe konnten bereits drei miRNA (hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p und hsa-miR-532-5p) als unter Interferon-beta-1b-Therapie bei MS-Patienten verändert exprimiert validiert werden. Das tatsächliche Potential der insgesamt 20 gefilterten miRNA als Biomarker für die biologische Wirkung der IFN-beta-Therapie sollte in zukünftigen Studien näher untersucht und gezielt überprüft werden.

Die Forschung zu den Einflüssen von miRNA auf die Pathophysiologie der MS und auf ihre Therapien ist noch ein sehr junges Feld. Besonders die Relevanz von miRNA als diagnostische, prognostische bzw. therapeutische Biomarker gilt es in der Zukunft näher zu evaluieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein erster wichtiger Beitrag diesbezüglich geleistet werden. In beiden Teilen dieser Arbeit konnte ein Einblick darüber gegeben werden, wie mit den komplexen Informationen zu miRNA, u.a. denen aus Datenbanken, aber auch mit eigenen erhobenen Daten, umgegangen werden kann, um miRNA im Kontext der MS näher zu analysieren.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Flachenecker P *et al.* National MS registries. J Neurol. 2008;255 Suppl 6:102-8.
- [2] Kingwell E *et al.* Relative mortality and survival in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83(1):61-6.
- [3] Sumelahti ML *et al.* Causes of death among patients with multiple sclerosis. Mult Scler. 2010;16(12):1437-42.
- [4] Flachenecker P *et al.* Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. Dtsch Arztebl Int. 2008;105(7):113-9.
- [5] Alonso A *et al.* Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. Neurology. 2008;71(2):129-35.
- [6] Simpson S Jr *et al.* Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2011;82(10):1132-41.
- [7] Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. J Neurovirol. 2000;6 Suppl 2:S134-40.
- [8] Zuvich RL *et al.* Genetics and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. Semin Immunol. 2009;21(6):328-333.
- [9] Buchanan RJ *et al.* Comparisons of Latinos, African Americans, and Caucasians with multiple sclerosis. Ethn Dis. 2010;20(4):451-7.
- [10] O'Gorman C *et al.* Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. Neuroepidemiology. 2013;40(1):1-12.
- [11] Jersild C *et al.* Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. Lancet. 1973;2(7840):1221-5.
- [12] Goris A *et al.* Progress in multiple sclerosis genetics. Goris A *et al.* Curr Genomics. 2012;13(8):646-63.
- [13] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet. 2013;45(11):1353-60.
- [14] Hafler DA *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. N Engl J Med. 2007;357(9):851-62.
- [15] Jakkula E. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. Am J Hum Genet. 2010;86(2):285-91.
- [16] Islam T *et al.* Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. Neurology. 2007;69(4):381-8.
- [17] Bäärnhielm M *et al.* Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. Eur J Neurol. 2012;19(7):955-62.
- [18] Correale J *et al.* Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. Brain. 2009;132(Pt 5):1146-60.
- [19] Ascherio A *et al.* Vitamin D and multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2010;9(6):599-612.

- [20] Dobson R *et al.* The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(4):427-32.
- [21] Hedström AK *et al.* High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler.* 2012;18(9):1334-6.
- [22] Hedström AK *et al.* Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(11):867-74.
- [23] Fujinami RS *et al.* Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(8):2346-50.
- [24] Ruprecht K. Multiple Sklerose und Epstein-Barr-Virus: Eine aktuelle Übersicht. *Akt Neurol.* 2013;40(07):400-7.
- [25] Soldan SS *et al.* Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med.* 1997;3(12):1394-7.
- [26] Croxford JL *et al.* Viral delivery of an epitope from *Haemophilus influenzae* induces central nervous system autoimmune disease by molecular mimicry. *J Immunol.* 2005;174(2):907-17.
- [27] Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol.* 2008;255 Suppl 6:2-6.
- [28] O'Connor KC *et al.* The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol.* 2001;21(2):81-92.
- [29] Constantinescu CS *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1079-106.
- [30] Conradi S *et al.* Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol.* 2011;11:123.
- [31] Fleming JO *et al.* Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology.* 2006;67(11):2085-6.
- [32] Kakalacheva K *et al.* Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(2):132-40.
- [33] Wucherpfennig KW. Structural basis of molecular mimicry. *J Autoimmun.* 2001;16(3):293-302.
- [34] Ascherio A *et al.* 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clin Exp Immunol.* 2010;160(1):120-4.
- [35] Wegner C. Recent insights into the pathology of multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115 Suppl 1:S38-41.
- [36] Stuke K *et al.* Symptomatology of MS: results from the German MS Registry. *J Neurol.* 2009;256(11):1932-5.
- [37] Compston A *et al.* Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;372(9648):1502-17.
- [38] Mahdavian S *et al.* Multiple sclerosis: a supplement on the disease state, current therapies, and investigational treatments. *J Pharm Pract.* 2010;23(2):91-100.
- [39] Van der Valk *et al.* Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26(1):2-10.

- [40] Reynolds R *et al.* The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2011;122(2):155-70.
- [41] Ferguson B. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 1997; 120 (Pt 3):393-9.
- [42] Hagemeyer K *et al.* Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression. *Histol Histopathol.* 2012;27(3):277-87.
- [43] Bø L *et al.* Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler.* 2003;9(4):323-31.
- [44] Gilmore CP *et al.* Regional variations in the extent and pattern of grey matter Demyelinisierung in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(2):182-7.
- [45] Codarri L *et al.* Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. *Trends Immunol.* 2013;34(3):114-9.
- [46] Engelhardt B *et al.* Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 2012c;33(12):579-89.
- [47] Kuerten S *et al.* The significance of a B cell-dependent immunopathology in multiple sclerosis. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2011;79(2):83-91.
- [48] Comabella M *et al.* Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2012;142(1):2-8.
- [49] Fletcher JM *et al.* T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):1-11.
- [50] Rostami A *et al.* Role of TH17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013;333(1-2):76-87.
- [51] Costantino CM *et al.* Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol.* 2008;28(6):697-706.
- [52] Caramia F *et al.* Cognitive deficits in multiple sclerosis: a review of functional MRI studies. *Neurol Sci.* 2010;31(Suppl 2):S239-43.
- [53] Debouverie M *et al.* Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. *Eur J Neurol.* 2008;15(9):916-21.
- [54] Thrower BW *et al.* Clinically isolated syndromes: predicting and delaying multiple sclerosis. *Neurology.* 2007;68(24 Suppl 4):S12-5.
- [55] McDonald WI *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-7.
- [56] Leray E *et al.* Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(Pt 7):1900-13.
- [57] Rovaris M *et al.* Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol.* 2006;5(4):343-54.
- [58] Lublin FD *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology.* 1996;46(4):907-11.

- [59] Thompson AJ *et al.* Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol.* 2000;47(6):831-5.
- [60] Rae-Grant AD. Unusual symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis)*. 2013;19(4 Multiple Sclerosis):992-1006.
- [61] Zettl UK *et al.* Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev.* 2012;11(3):167-73.
- [62] Polman CH *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292-302.
- [63] Kraft GH. Evoked potentials in multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2013;24(4):717-20.
- [64] Tumani H *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2009;35(2):117-27.
- [65] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33(11):1444-52.
- [66] Polman CH *et al.* The multiple sclerosis functional composite: a clinically meaningful measure of disability. *Neurology.* 2010;74 Suppl 3:S8-15.
- [67] Buck D *et al.* Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives. *J Neurol.* 2011;258(10):1747-62.
- [68] Malcomson KS *et al.* Psychosocial interventions in people with multiple sclerosis: a review. *J Neurol.* 2007;254(1):1-13.
- [69] Köhler W *et al.* Psychoedukatives Training für Patienten mit Multipler Sklerose. *Der Nervenarzt.* 2009, 80(1) Suppl:16-17
- [70] Deutsche Gesellschaft für Neurologie. DGN/KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS. URL: http://www.dmsg.de/dokumentearchiv/dgnkknms_msll_20140423.pdf (Stand: 30.04.2014).
- [71] Liu SY *et al.* Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(11):4239-44.
- [72] Runkel L *et al.* Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res.* 1998;15(4):641-9.
- [73] Goodin DS. Treatment of multiple sclerosis with human beta interferon. *Int MS J.* 2005;12(3):96-108.
- [74] van Baarsen LG *et al.* Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One.* 2008;3(4):e1927.
- [75] Sellebjerg F *et al.* Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation. *Eur J Neurol.* 2009;16(12):1291-8.
- [76] Goertsches RH *et al.* Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-beta-1b treatment in relapsing remitting MS. *Pharmacogenomics.* 2010;11(2):147-61.
- [77] Hundeshagen A *et al.* Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation.* 2012;9:140.

- [78] Mendes A *et al.* Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69(3):536-43.
- [79] Pachner AR *et al.* Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon beta: the Insight study. *Neurology.* 2009;73(18):1493-500.
- [80] Hesse D *et al.* Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology.* 2009;73(5):372-7.
- [81] van der Voort LF *et al.* Clinical effect of neutralizing antibodies to interferon beta that persist long after cessation of therapy for multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2010;67(4):402-7.
- [82] Graber JJ *et al.* Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011;305(1-2):1-10.
- [83] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate end points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
- [84] Bielekova B *et al.* Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain.* 2004;127(Pt 7):1463-78.
- [85] Puntmann VO *et al.* How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J.* 2009;85(1008):538-45.
- [86] Silva G *et al.* Biomarkers in neurology. *Front Neurol Neurosci.* 2009;25:55-61.
- [87] Zwierzina H *et al.* Biomarkers in drug development. *Ann Oncol.* 2008;19 Suppl 5:v33-7.
- [88] Festa ED *et al.* Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15: 1271-9.
- [89] Khademi M *et al.* Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler.* 2011;17(3):335-43.
- [90] Hecker M *et al.* Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29648.
- [91] Saikumar J *et al.* Noninvasive Micromarkers. *Clin Chem.* 2014. (Epub ahead of print) doi:10.1373/clinchem.2013.216044
- [92] Thamilarasan M *et al.* MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev.* 2012;11(3):174-9.
- [93] Bartel DP *et al.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
- [94] Lee RC *et al.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
- [95] Wightman B *et al.* Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62.
- [96] Reinhart BJ *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
- [97] Pasquinelli AE *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86-9.

- [98] Lagos-Quintana M *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
- [99] Griffiths-Jones S *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D140-4.
- [100] Lewis BP *et al.* Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
- [101] Rodriguez A *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10A):1902-10.
- [102] Kim VN *et al.* MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
- [103] Breving K *et al.* The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(8):1316-29.
- [104] Filipowicz W *et al.* Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-14.
- [105] Ruby JG *et al.* Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-6.
- [106] Hoefig KP *et al.* MicroRNAs grow up in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):281-7.
- [107] Krek A *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
- [108] Chatterjee S *et al.* Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*. 2009;101(5):251-62.
- [109] Geissmann T *et al.* The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol*. 2009;6(2):153-60.
- [110] Daniel W *et al.* Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):6845-53.
- [111] Backes C *et al.* A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(13):4476-86.
- [112] Eulalio A *et al.* Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008;132(1):9-14.
- [113] Zhang B *et al.* MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol*. 2007;210(2):279-89.
- [114] Rossi S *et al.* microRNAs in colon cancer: a roadmap for discovery. *FEBS Lett*. 2012;586(19):3000-7.
- [115] Ono K *et al.* MicroRNAs and Cardiovascular Diseases. *FEBS J*. 2011;278(10):1619-1633.
- [116] de Faria O *et al.* MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Front Genet*. 2012;3:311.
- [117] Furer V *et al.* The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2010;136(1):1-15.
- [118] Landgraf P *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-14.

- [119] Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res.* 2012;110(4):638-50.
- [120] Lykken EA *et al.* microRNAs at the regulatory frontier: an investigation into how microRNAs impact the development and effector functions of CD4 T cells. *Immunol Res.* 2011;49(1-3):87-96.
- [121] Wu T *et al.* Temporal expression of microRNA cluster miR-17-92 regulates effector and memory CD8⁺ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):9965-70.
- [122] Stahl HF *et al.* miR-155 inhibition sensitizes CD4⁺ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS One.* 2009;4(9):e7158.
- [123] de Yébenes VG *et al.* Regulation of B-cell development and function by microRNAs. *Immunol Rev.* 2013;253(1):25-39.
- [124] Fazi F *et al.* A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell.* 2005;123(5):819-31.
- [125] Fontana L *et al.* MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol.* 2007;9(7):775-87.
- [126] Taganov KD *et al.* NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(33):12481-6.
- [127] Zhou R *et al.* miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated transactivation of interleukin-8 gene. *PLoS One.* 2012;7(1):e30772.
- [128] Jiang Q *et al.* miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D98-104.
- [129] Keller A *et al.* Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One.* 2009;4(10):e7440.
- [130] Otaegui D *et al.* Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2009;4(7):e6309.
- [131] Du C *et al.* MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1252-9.
- [132] Cox MB *et al.* MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One.* 2010;5(8):e12132.
- [133] Waschbisch A *et al.* Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One.* 2011;6(9):e24604.
- [134] Kozomara A *et al.* miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D152-7.
- [135] Papadopoulos GL *et al.* The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D155-8.
- [136] Hsu SD *et al.* miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D163-9.
- [137] Alexiou P *et al.* Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics.* 2009;25(23):3049-55.

- [138] Yue D *et al.* Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Curr Genomics*. 2009;10(7):478-92.
- [139] Friedman RC *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
- [140] Maragkakis M *et al.* DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W273-6.
- [141] Lall S *et al.* A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2006;16(5):460-71.
- [142] Griffiths-Jones S *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D154-8.
- [143] Betel D *et al.* The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D149-53.
- [144] Xiao F *et al.* miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D105-10
- [145] Dweep H. *Et al.* miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes, *J Biomed Inform*. 2011;44(5):839-47.
- [146] Ruepp A *et al.* PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome Biology*. 2010;11:R6
- [147] Wang X *et al.* miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. 2008;14(6):1012-17
- [148] Wang X *et al.* Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics*. 2008;24(3):325-32.
- [149] Liang Y *et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 2007;8:166.
- [150] Hausser J *et al.* MirZ: an integrated microRNA expression atlas and target prediction resource. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W266-72.
- [151] Alexiou P *et al.* miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Database issue):D137-41.
- [152] Chien CH *et al.* Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(21):9345-56.
- [153] Le Béhec A *et al.* MIR@NT@N: a framework integrating transcription factors, microRNAs and their targets to identify sub-network motifs in a meta-regulation network model. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:67.
- [154] Gong J *et al.* Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*. 2012;33(1):254-63.
- [155] Vergoulis T *et al.* Tarbase 6.0: Capturing the Exponential Growth of miRNA Targets with Experimental Support. *Nucl. Acids Res*. 2012;40(D1):D222-29.
- [156] Friard O *et al.* CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:435.
- [157] Li Y *et al.* HMDD v2.0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):D1070-4.

- [158] Lytle JR *et al.* Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(23):9667-72.
- [159] Schnall-Levin M *et al.* Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome Res*. 2011;21(9):1395-403.
- [160] Hofacker IL. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3429-31.
- [161] Krüger J *et al.* RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W451-4.
- [162] Miranda KC *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 2006;126(6):1203-17.
- [163] Kertesz M *et al.* The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007;39(10):1278-84.
- [164] Kel AE *et al.* MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3576-9.
- [165] Wingender E *et al.* TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):316-9.
- [166] Karolchik D *et al.* The UCSC Genome Browser. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2007;Chapter 1:Unit 1.4.
- [167] Landthaler M *et al.* Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA*. 2008;14(12):2580-96.
- [168] Lim LP *et al.* Mikroarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-73.
- [169] Smoot ME *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2.
- [170] Mahony S *et al.* STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W253-8.
- [171] Lai X *et al.* Computational analysis of target hub gene repression regulated by multiple and cooperative miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(18):8818-34.
- [172] Papadopoulos GL *et al.* DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics*. 2009;25(15):1991-3.
- [173] Hung JH. Gene Set/ Pathway enrichment analysis. *Methods Mol Biol*. 2013;939:201-13.
- [174] Kanehisa M *et al.* KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D109-14.
- [175] Ashburner M *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-9.
- [176] Safran M *et al.* GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)*. 2010;2010:baq020.
- [177] Falcon S *et al.* Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*. 2007;23(2):257-8.
- [178] Kundt G *et al.* Epidemiologie und Medizinische Biometrie 4. Shaker Verlag, Aachen 2009. 4. Auflage :20-24

- [179] Puri KS *et al.* Declaration of Helsinki, 2008: implications for stakeholders in research. *J Postgrad Med.* 2009;55(2):131-4.
- [180] Fuss IJ *et al.* Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol.* 2009;Chapter 7:Unit7.1.
- [181] Higuchi R *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-7.
- [182] Chen C *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179.
- [183] Malone JH *et al.* Mikroarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 2011;9:34.
- [184] William S *et al.* Locally-Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *J Am Stat Assoc.* 1988;83(403):596–610. 1988.
- [185] Meyer SU *et al.* Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs--a comparative study. *PLoS One.* 2012;7(6):e38946.
- [186] Hubbell E *et al.* Robust estimators for expression analysis. *Bioinformatics.* 2002;18(12):1585-92.
- [187] Affymetrix Inc. Statistical Algorithms Description Document, URL: www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd_whitepaper.pdf (Stand 09.08.2013).
- [188] Yang IV *et al.* Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in Mikroarray assays. *Genome Biol.* 2002;3(11):research0062.
- [189] Hecker M *et al.* Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:262.
- [190] Angerstein C *et al.* Integration of MicroRNA databases to study MicroRNAs associated with multiple sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2012;45(3):520-35.
- [191] Barrett T *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D991-5.
- [192] Hecker M *et al.* MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16087-110.
- [193] Saini HK *et al.* Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics.* 2008;9:564.
- [194] Song X *et al.* Prediction of pre-miRNA with multiple stem-loops using pruning algorithm. *Comput Biol Med.* 2013;43(5):409-16.
- [195] Rainer J *et al.* Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2009;23(4):746-52.
- [196] Ventura A *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 2008;132(5):875-86.
- [197] Xiao C *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol.* 2008;9(4):405-14.
- [198] Thapa DR *et al.* Overexpression of microRNAs from the miR-17-92 paralog clusters in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. *PLoS One.* 2011;6(6):e20781.

- [199] Barbato C *et al.* Computational Challenges in miRNA Target Predictions: To Be or Not to Be a True Target? J Biomed Biotechnol. 2009;2009:803069.
- [200] Wu S *et al.* Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. Oncogene. 2010;29(15):2302-8.
- [201] Santiago-Raber ML *et al.* Role of cyclin kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. J Immunol. 2001;167(7):4067-74.
- [202] De Santis G *et al.* Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2010;226(1-2):165-71.
- [203] DeRyckere D *et al.* E2F1 and E2F2 are differentially required for homeostasis-driven and antigen-induced T cell proliferation in vivo. Immunol. 2005;175(2):647-55.
- [204] Iglesias AH *et al.* Mikroarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. J Neuroimmunol. 2004;150(1-2):163-77.
- [205] Riveros C *et al.* A transcription factor map as revealed by a genome-wide gene expression analysis of whole-blood mRNA transcriptome in multiple sclerosis. PLoS One. 2010;5(12):e14176.
- [206] Buckler JL *et al.* Regulation of T-cell responses by PTEN. Immunol Rev. 2008;224:239-48.
- [207] Suzuki A *et al.* T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. Immunity. 2001;14(5):523-34.
- [208] Harrington EP *et al.* Oligodendrocyte PTEN is required for myelin and axonal integrity, not remyelination. Ann Neurol. 2010;68(5):703-16.
- [209] Johnson TA *et al.* Antigen-induced Pten gene deletion in T cells exacerbates neuropathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. Am J Pathol. 2008;172(4):980-92.
- [210] Chaudhry A *et al.* Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of TH17 cell-mediated inflammation. Immunity. 2011;34(4):566-78.
- [211] Durant L *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity. 2010;32(5):605-15.
- [212] Liu X *et al.* Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. J Immunol. 2008;180(9):6070-6.
- [213] Frisullo G *et al.* The persistency of high levels of pSTAT3 expression in circulating CD4+ T cells from CIS patients favors the early conversion to clinically defined multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2008;205(1-2):126-34.
- [214] Martinez-Forero I *et al.* IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. Eur J Immunol. 2008;38(2):576-86.
- [215] Lill CM *et al.* Independent replication of STAT3 association with multiple sclerosis risk in a large German case-control sample. Neurogenetics. 2012;13(1):83-6.
- [216] ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012;489(7414):57-74.
- [217] Crispín JC *et al.* Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2009;8(3):190-5.

- [218] Grundström S *et al.* Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2004;279(9):8460-8.
- [219] Rieckmann P *et al.* Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol.* 1995;37(1):82-8.
- [220] Sato W *et al.* CCR2(+)CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2012;189(10):5057-65.
- [221] Hilliard B *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 1999;163(5):2937-43.
- [222] Bonetti B *et al.* Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol.* 1999;155(5):1433-8.
- [223] Bert AG *et al.* Reconstitution of T cell-specific transcription directed by composite NFAT/Oct elements. *J Immunol.* 2000;165(10):5646-55.
- [224] Mordvinov VA *et al.* Binding of YY1 and Oct1 to a novel element that downregulates expression of IL-5 in human T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(6):1125-35.
- [225] Martinez NJ *et al.* A C. elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev.* 2008;22(18):2535-49.
- [226] Martinez NJ *et al.* The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays.* 2009;31(4):435-45.
- [227] Nam S *et al.* MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W356-62.
- [228] Johnson GL *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002;298(5600):1911-2.
- [229] Rincón M *et al.* Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.* 1998;17(10):2817-29.
- [230] Ferrandi C *et al.* Characterization of immune cell subsets during the active phase of multiple sclerosis reveals disease and c-Jun N-terminal kinase pathway biomarkers. *Mult Scler.* 2011;17(1):43-56.
- [231] Tran EH *et al.* Inactivation of JNK1 enhances innate IL-10 production and dampens autoimmune inflammation in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(36):13451-6.
- [232] Noubade R *et al.* Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 2011;118(12):3290-300.
- [233] Bettelli E *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441(7090):235-8.
- [234] Veldhoen M *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179-89.
- [235] Veldhoen M *et al.* Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol.* 2006;7(11):1151-6.

- [236] Meoli EM *et al.* TGF- β signaling is altered in the peripheral blood of subjects with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2011;230(1-2):164-8.
- [237] Luo J *et al.* Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3306-15.
- [238] Shalgi R, Lieber D, Oren M, Pilpel Y. Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Comput Biol.* 2007;3(7):e131.
- [239] Tu K *et al.* Combinatorial network of primary and secondary microRNA-driven regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(18):5969-80.
- [240] Artmann S *et al.* Detection of simultaneous group effects in microRNA expression and related target gene sets. *PLoS One.* 2012;7(6):e38365
- [241] Guerau-de-Arellano M *et al.* miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: from Mikroarray to deep sequencing. *J Neuroimmunol.* 2012;248(1-2):32-9.
- [242] Junker A *et al.* The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(1):56-9.
- [243] Noorbakhsh F *et al.* Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(Pt 9):2703-21.
- [244] Lindberg RL *et al.* Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.* 2010;40(3):888-98.
- [245] Keller A *et al.* Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler.* 2014;20(3):295-303.
- [246] Paraboschi EM *et al.* Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):8695-712.
- [247] Martinelli-Boneschi F *et al.* MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neurosci Lett.* 2012;508(1):4-8.
- [248] Fenoglio C *et al.* Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2011;504(1):9-12.
- [249] Becker N *et al.* Pre-analytical variables in miRNA analysis. *Clin Biochem.* 2013;46(10-11):861-8.
- [250] D'hooghe MB *et al.* Female gender and reproductive factors affecting risk, relapses and progression in multiple sclerosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2013;75(2):73-84.
- [251] Bove R *et al.* Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol.* 2013;149(2):201-10.
- [252] Goertsches RH *et al.* Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy. *Pharmacogenomics.* 2011;12(3):423-32.
- [253] Burns M *et al.* Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology.* 2008;226:1513-24.
- [254] Ferrari F *et al.* Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:446.

- [255] Sievers C *et al.* Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects. *Clin Immunol.* 2012;144(1):70-9.
- [256] Witwer KW *et al.* MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol.* 2010;184(5):2369-76.
- [257] Swaminathan S *et al.* Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4+ T cells alters IL-10 expression. *J Immunol.* 2012;188(12):6238-46.
- [258] Gandhi R *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2013;73(6):729-40.
- [259] Bergman P *et al.* Next-generation sequencing identifies microRNAs that associate with pathogenic autoimmune neuroinflammation in rats. *J Immunol.* 2013;190(8):4066-75.
- [260] Almanza G *et al.* Selected microRNAs define cell fate determination of murine central memory CD8 T cells. *PLoS One.* 2010;5(6):e11243.
- [261] Lehmann SM *et al.* An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2012;15(6):827-35.
- [262] Wu H *et al.* miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One.* 2007;2(10):e1020.
- [263] Lorenzi JC *et al.* miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. *Int J Neurosci.* 2012;122(8):466-71.
- [264] Søndergaard HB *et al.* Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(14):1849-57.
- [265] Mott JL *et al.* Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J Cell Biochem.* 2010;110(5):1155-64.
- [266] Ridolfi E *et al.* Expression and Genetic Analysis of MicroRNAs Involved in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):4375-84.
- [267] Dhib-Jalbut S *et al.* Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S17-24.
- [268] Hecker M *et al.* Interferon-beta therapy in multiple sclerosis: the short-term and long-term effects on the patients' individual gene expression in peripheral blood. *Mol Neurobiol.* 2013;48(3):737-56.
- [269] Haller O *et al.* Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* 2002;3(10):710-7.
- [270] Regis G *et al.* Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(4):351-9.
- [271] Cheon H *et al.* The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):33-40.
- [272] Kim HS *et al.* STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal.* 2007;19(3):454-65.
- [273] Oestreich KJ *et al.* Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(2):191-5.
- [274] Kohanbash G *et al.* MicroRNAs and STAT interplay. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(1):70-5.
- [275] Fitzgerald KA. The interferon inducible gene: Viperin. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):131-5.

- [276] Qiu LQ *et al.* Viperin is required for optimal Th2 responses and T-cell receptor-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Blood*. 2009;113(15):3520-9.

8. Anhang

8.1. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch immunmedierte Erkrankung des zentralen Nervensystems, die individuell sehr heterogen verläuft und mit neurologischen Defiziten einhergeht. Die häufigste Verlaufsform stellt die schubförmig-remittierende MS dar, welche u.a. mit immun-modulatorisch wirksamen Typ I Interferonen (IFN), wie IFN-beta-1b, behandelt wird, um Schubraten und Krankheitsaktivität zu reduzieren.
2. Bisher existieren nur wenig klinisch etablierte diagnostische bzw. therapeutische Biomarker für MS. In der Vergangenheit wurden microRNA (miRNA) als bei MS-Patienten verändert exprimiert beschrieben und als potentielle Biomarker-Kandidaten diskutiert. Diese miRNA sind einzelsträngige, 21-22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNA, welche Gene in Zellen posttranskriptionell herunter-regulieren.
3. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl unterschiedlicher miRNA-Datenbanken entwickelt, um verschiedene Informationen zu miRNA zu katalogisieren und potentielle Zielgene mit Hilfe von bioinformatischen Algorithmen vorherzusagen. Der Aufbau und die Inhalte der Datenbanken unterliegen einer großen Diversität, die es dem Nutzer erschwert, sich einen schnellen Einblick in diese komplexe Thematik zu verschaffen.
4. Ziel dieser Arbeit ist einerseits, einen Überblick über die Vielzahl an miRNA-Datenbanken zu geben und anhand einer Analyse zum Thema „miRNA im Kontext der MS“ zu zeigen, wie mit Informationen aus verschiedenen Datenbanken umgegangen werden kann. Insbesondere soll demonstriert werden, wie Daten aus verschiedenen Datenbanken unter Berücksichtigung von Informationen anderer Datenbanken extrahiert und somit integrativ ausgewertet werden können. Die Analysen sollen helfen der MS zu Grunde liegende Prozesse und immunologische Vorgänge auf Transkriptionsebene besser zu verstehen.
5. Andererseits wird evaluiert, inwiefern sich die miRNA- und mRNA-Expressionslevel im Blut von MS-Patienten im Zeitverlauf einer IFN-beta-1b-Therapie verändern und ob sich miRNA als potentielle Biomarker für die biologische Wirkung der IFN-beta-1b-Therapie eignen. Daneben sollen potentielle Interaktionen zwischen den unter Therapie differentiell exprimierten miRNA und mRNA aufgedeckt werden. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, den Wirkmechanismus der IFN-beta-Therapie auf molekularer Ebene besser nachzuvollziehen.

6. Es wurden miRNA, welche in der miRNA-Datenbank miR2Disease als MS-assoziiert gelistet sind, mit Hilfe anderer Datenbanken (u.a. miRBase, miRGen 2.0, smirnaDB, miRWalk und miRTarBase) auf verschiedene Gesichtspunkte, z.B. potentielle Interaktionen mit Zielgenen, molekulare Funktionen und Signalwege, sie regulierende Transkriptionsfaktoren sowie ihre Expressionsmuster in verschiedenen Zellen und Geweben, integrativ untersucht und die Ergebnisse durch eigene Literaturrecherche näher evaluiert.
7. Außerdem wurden miRNA- und mRNA-Expressionsänderungen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von 6 MS-Patienten unter einer erstmals initiierten IFN-beta-1b-Therapie erfasst. Dazu wurden Blutproben zu 4 Messzeitpunkten (vor Therapiebeginn sowie 2 Tage, 4 Tage und einen Monat danach) entnommen und die Expressionslevel der miRNA bzw. mRNA im Zeitverlauf mittels hierfür geeigneter TaqMan-Arrays bzw. Affymetrix-Mikroarrays parallel detektiert. Mit Hilfe der Datenbanken miRTarBase und miRWalk wurden unter Therapie differentiell exprimierten miRNA und mRNA auf potentielle Interaktionen geprüft.
8. Die beiden miRNA hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-20b-5p, welche bei der Literaturbasierten Analyse die meisten Interaktionen zu vorhergesagten Zielgenen aufweisen, können den paralogen Clustern miR-17~92 und miR-106a~363 zugeordnet werden. Unter den potentiellen Zielgenen der MS-assoziierten miRNA befinden sich CDKN1A, PTEN sowie STAT1. Viele Zielgene nehmen an dem MAPK-Signalweg bzw. dem TGF-beta-Signalweg teil oder besitzen Transkriptionsfaktor-Aktivität. Zu den Transkriptionsfaktoren, welche die MS-assoziierten miRNA regulieren, zählen u.a. AP1, NFkappaB und OCT-1.
9. Es konnten insgesamt 20 miRNA und 95 mRNA als unter IFN-beta-1b-Therapie verändert exprimiert detektiert werden, wobei die stärksten Änderungen einen Monat nach Therapiebeginn zu verzeichnen waren. Bei den 95 mRNA überwog zu allen Zeitpunkten der Anteil der hoch-regulierten Gene dem der herab-regulierten Gene, wohingegen bei den miRNA der Anteil an niedriger exprimierten miRNA überwog. Für 34 der 95 unter Therapie differentiell exprimierten Gene konnten zu 15 der 20 miRNA potentielle Interaktionen aufgedeckt werden
10. Die miRNA der Cluster miR-17~92 und miR-106a~363 wurden wiederholt bei MS-Patienten als verändert exprimiert beschrieben. Die potentiellen Zielgene CDKN1A, PTEN und STAT1 der 16 MS-assoziierten miRNA spielen nach dem aktuellen Stand der Forschung eine wichtige Rolle bei der T Zelldifferenzierung sowie in der Pathophysiologie der MS. Dass viele Zielgene Transkriptionsfaktor-Aktivität besitzen, ist

ein Hinweis auf komplexe Rückkopplungsschleifen, welche häufig in miRNA-mRNA-Interaktionsnetzwerken zu finden sind

11. Einige der differentiell exprimierten 20 miRNA (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29c-3p) aus dem zweiten Teil der Arbeit wurden bereits früher bei MS-Patienten als verändert exprimiert beschrieben. Unter anderem spielt die let-7-Familie und hsa-miR-16-5p eine Rolle bei der T-Zelldifferenzierung. Das Potential der 20 differentiell exprimierten miRNA als Biomarker für die biologische und klinische Wirkung der IFN-beta-Therapie gilt es in weiteren zukünftigen Studien, z.B. mit größeren Patientenkohorten oder durch Betrachtung verschiedener Immunzellsubtypen, näher zu untersuchen bzw. zu validieren.

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Verlaufsformen der MS (mod. nach [58]).	Seite 11
Abb. 2:	Schema der microRNA-Biogenese und der Regulation von Ziel-mRNA durch microRNA in einer Zelle	Seite 21
Abb. 3:	Flussschema des Studiendesigns zur integrativen Analyse von Multiple Sklerose-assoziierten microRNA.	Seite 31
Abb. 4:	Bildliche Veranschaulichung des longitudinalen Studiendesigns.	Seite 42
Abb. 5:	Die Anzahl identisch vorhergesagter Zielgene für die 16 MS-assoziierten miRNA beim paarweisen Vergleich von je 2 Algorithmen.	Seite 51
Abb. 6:	Die Anzahl der mit Hilfe von miRWalk vorhergesagten Zielgene der MS-assoziierten miRNA (mod. nach [190]).	Seite 51
Abb. 7:	Anzahl der miRNA-mRNA-Interaktionen, welche konsistent von mehreren Algorithmen berechnet wurden.	Seite 52
Abb. 8:	Netzwerkvisualisierung der Interaktionen zwischen den MS-assoziierten miRNA, den Zielgenen und den Transkriptionsfaktoren (mod. nach [190]).	Seite 55
Abb. 9:	<i>Heatmap</i> der Expressionslevel von den 16 MS-assoziierten miRNA (mod. nach [190]).	Seite 58
Abb. 10:	Die normalisierten Daten aller gemessenen miRNA von allen 6 Patienten zu den 4 Messzeitpunkten.	Seite 61
Abb. 11:	Boxplot der Verteilung der mRNA-Expressionswerte vor und nach Normalisierung der Daten.	Seite 62
Abb. 12:	Veränderung der Expression von miRNA im Zeitverlauf unter Therapie (mod. nach [192]).	Seite 64
Abb. 13:	Die mRNA-Expressionslevel im Zeitverlauf unter IFN-beta-1b-Therapie (mod. nach [192]).	Seite 65
Abb. 14:	Visualisierung der Interaktionen zwischen differentiell exprimierten miRNA und mRNA (mod. nach [192]).	Seite 68

8.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Diagnose der RRMS nach den überarbeiteten McDonald-Kriterien von 2010 [62].	Seite 13
Tab. 2:	Stufentherapie der Multiplen Sklerose (mod. nach [70]).	Seite 15
Tab. 3:	Auswahl von microRNA-Datenbanken.	Seite 25
Tab. 4:	Allgemeine Informationen zu den untersuchten Patienten.	Seite 41
Tab. 5:	Charakteristika der MS-assoziierten microRNA.	Seite 50
Tab. 6:	Übersicht zu miRTarBase-gelisteten Interaktionen der MS-assoziierten microRNA.	Seite 53
Tab. 7:	Ausgewählte TF mit Interaktionen zu den MS-assoziierten microRNA.	Seite 54
Tab. 8:	Top 15 der überrepräsentierten Funktionen und Signalwege der Zielgene.	Seite 56
Tab. 9:	Schubereignisse und EDSS-Score der 6 Patienten im Zeitverlauf.	Seite 59
Tab. 10:	Anzahl der detektierten microRNA für die 6 Patienten im Zeitverlauf.	Seite 60
Tab. 11:	Die Top 10 der am höchsten exprimierten microRNA.	Seite 63
Tab. 12:	Differentiell exprimierte microRNA unter IFN-beta-1b-Therapie im Zeitverlauf.	Seite 64
Tab. 13:	Veränderte Genexpression unter IFN-beta-1b-Therapie (mod. nach [192])	Seite 66

8.4. Abkürzungsverzeichnis

Abb:	Abbildung
CDF:	<i>Chip Definition Files</i>
cDNA:	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
C. elegans:	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CPM:	Cyclophosphamid
Ct:	<i>Cycle Threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
Ct ^{norm} :	Normalisierter Ct-Wert (umgekehrt logarithmische Skala)
Daten ^{norm} :	Normalisierte Daten (lineare Skala)
DC:	<i>Dendritic Cells</i> (dendritische Zellen)
dsRBP:	Doppelsträngiges RNA-bindendes Protein
EAE:	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV:	Epstein-Barr-Virus
EDSS:	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
G:	Guanin
GEO:	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO:	<i>Gene Ontology</i>
HGNC:	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HLA:	Humanes Leukozytenantigen
IFN:	Interferon
IgG:	Immunglobulin G
IL:	Interleukin
i.m:	Intramuskulär
IVIg:	Intravenös applizierte Immunglobuline
KEGG:	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KIS:	Klinisch Isoliertes Syndrom
log-FC:	Logarithmischer <i>Fold-Change</i> zur Basis 2

MAID:	<i>MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion</i>
MAS5.0:	<i>Micro-Array Suite 5.0</i>
MHC:	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
miRNA:	MicroRNA
mod:	Modifiziert
mRNA:	<i>Messenger RNA</i>
MRT:	Magnetresonanztomographie
MS:	Multiple Sklerose
MSFC:	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MW:	Mittelwert
NAK:	Neutralisierende Antikörper
NMO:	Neuromyelitis optica
Nt:	Nukleotid
OR:	Odds Ratio
P-bodies:	<i>Processing bodies</i>
PBMC:	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PI3K:	Phospho-Inositid-3-Kinase
PPMS:	Primär Progressive Multiple Sklerose
Pre-miRNA:	<i>Precursor microRNA</i>
Pri-miRNA:	<i>Primary microRNA</i>
PWM:	<i>Position weight matrix</i> (Positions-gewichtete Matriz)
RISC:	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Rnase III:	Ribonuklease III
RRMS:	<i>Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis</i> (schubförmig-remittierende Multiple Sklerose)
RT:	Reverse Transkriptase
SA:	Standardabweichung

s.c:	Subkutan
SNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismen)
SPMS:	Sekundär Progressive Multiple Sklerose
Tab:	Tabelle
TF:	Transkriptionsfaktor
TFBS:	Transkriptionsfaktor-Bindestelle
TGFbeta:	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNFalpha:	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRBP:	<i>Transactivator RNA binding protein</i>
Treg-Zelle:	Regulatorische T-Zelle
TH1-Zelle:	Typ 1-T-Helferzelle
TH17-Zelle:	Typ 17-T-Helferzelle
TH2-Zelle:	Typ 2-T-Helferzelle
TZR:	T-Zell-Rezeptor
U:	Uracil
UTR:	Untranslatierte Region
ZNS:	Zentrales Nervensystem

8.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation so vielseitig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl für die interessante Themengestaltung, die stete Förderung dieser Arbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Michael Hecker für die ausgezeichnete Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit danken. Durch seine hilfsbereite Art und Weise, die vielen produktiven Diskussionen und vor allem durch die bioinformatische und statistische Auswertung der Daten hat er mich in ganz besonderer Weise bei dieser Dissertation unterstützt.

Ich danke den Kollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der Sektion für Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock (Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl) und des Instituts für Immunologie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen) für die vielfältige Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Frau Christa Tiffert für die Studienkoordination, Patientenbetreuung sowie Protokoll-gerechte Durchführung der Blutentnahmen, Herrn Madhan Thamilarsan für die Aufbereitung der Proben und Herrn Dr. rer. nat. Dirk Koczan für die Erhebung der mRNA- und miRNA-Daten des zweiten Teils dieser Doktorarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich insbesondere meinen Eltern, meiner restlichen Familie, meinem Partner und meinen Freunden danken, die während der Entstehung dieser Arbeit immer währende Motivation, Verständnis und Unterstützung aufgebracht haben.

8.6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Angerstein C, Hecker M, Paap BK, Koczan D, Thamilarasan M, Thiesen HJ, Zettl UK. Integration of MicroRNA databases to study MicroRNAs associated with multiple sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2012; 45(3):520-35.

Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, **Angerstein C**, Kandulski O, Fatum C, Hartmann C, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J Neuroinflammation*. 2012;9:140.

Poster

Angerstein C, Hecker M, Paap BK, Koczan D, Thamilarasan M, Thiesen HJ, Zettl UK. Integration of MicroRNA Databases to Study MicroRNAs Associated with Multiple Sclerosis. European Charcot Foundation Symposium, Marbella, Spanien, November 2012.

Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Goertsches R, Kandulski O, Fatum C, Hartmann C, **Angerstein C**, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. Elevated interferon signature in a subset of multiple sclerosis patients: pathway and clinical importance. European Charcot Foundation Symposium, Marbella, Spanien, November 2012.

Hecker M, Thamilarasan M, **Angerstein C**, Paap BK, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. MicroRNA expression dynamics during interferon-beta treatment in peripheral blood of multiple sclerosis patients. ECTRIMS, Lyon, Frankreich, Oktober 2012. *Mult Scler*. 2012;18 (4 Suppl): 55-277, P346. doi:10.1177/1352458512459019.

Hecker M, Thamilarasan M, Paap BK, **Angerstein C**, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. MicroRNA expression in blood cells of multiple sclerosis patients receiving interferon-beta therapy. 85. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Hamburg, Deutschland, September 2012.

Hecker M, Thamilarasan M, **Angerstein C**, Paap BK, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. MicroRNA expression changes in response to interferon-beta-1b therapy in blood cells of patients with multiple sclerosis. AAN, New Orleans, USA, April 2012. *Neurology*. 2012;78 (Meeting Abstracts 1):P02.124. doi:10.1212/WNL.78.1_MeetingAbstracts.P02.124.

Thamilarasan M, **Angerstein C**, Paap BK, Koczan D, Goertsches RH, Hecker M, Jonas L, Mundkowski R, Zettl UK. MicroRNA detection and quantification in human peripheral blood microvesicles from multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b.ECTRIMS, Amsterdam, Niederlande, Oktober 2011. Mult Scler. 2011;17 (10 Suppl):S277-S505, P1097. doi:10.1177/1352458511422301.

Hecker M, Hundeshagen A, Paap BK, Goertsches R, Kandulski O, Christian Fatum C, Winkler C, **Angerstein C**, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. Elevated interferon signature in a subset of multiple sclerosis patients: pathway and clinical importance.ECTRIMS, Amsterdam, Niederlande, Oktober 2011. Mult Scler. 2011;17 (10 Suppl):S53-S276, P287. Doi:10.1177/1352458511422300.

Rostock, 18. Dezember 2014

8.7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Charlotte Johanna Angerstein, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „microRNA im Kontext der MS- Integrative Analyse von Informationen aus microRNA-Datenbanken und longitudinale Studie über Expressionsänderungen von microRNA unter Interferon-beta-Therapie im Blut von Patienten mit Multipler Sklerose“ eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Erhebung und Auswertung der Daten haben mich die in der Danksagung genannten Personen unterstützt. Die Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei anderen Abteilungen oder entsprechenden Einrichtungen einer Hochschule eingereicht.

Rostock, 18. Dezember 2014